

**Contribution à l'étude
de la conservation des
cortico-stéroïdes en milieu solide :
contrôle qualitatif et quantitatif**

THESE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte de
Médecine et de Pharmacie de LYON

le 3 Février 1965

par

SIN-THIM

né le 5 Mai 1934 à PHNEAY-Kg-Spen (Cambodge)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON

1965

**Contribution à l'étude de la conservation
des cortico-stéroïdes en milieu solide :
contrôle qualitatif et quantitatif**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552623_0041

**Contribution à l'étude
de la conservation des
cortico-stéroïdes en milieu solide :
contrôle qualitatif et quantitatif**

THESE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte de
Médecine et de Pharmacie de LYON

le 3 Février 1965

par

SIN-THIM

né le 5 Mai 1934 à PHNEAY-Kg-Spen (Cambodge)



Imprimerie Générale Lyonnaise
32, cours Gambetta, 32 - LYON

1965

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen Honoraire	M. J. LEPINE Membre de l'Institut
Doyen Honoraire	M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
Doyen	M. J.-F. CIER
Assesseur	M. M. LEVRAT
Assesseur	M. L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

Clinique Urologique	MM. CIBERT
Physique Biologique	PONTHUS (détaché à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique chirurgicale B	WERTHEIMER
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	FROMENT
Clinique médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	ENSELME
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie galénique	REVOL
Clinique gynécologique	POLLOSSON
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale A	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique traumatologique des membres	CREYSSEL
Clinique carcinologique	DARGENT
Anatomie pathologique	GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul
Anatomie	LATARIET
Pathologie chirurgicale	PEYCELON
Thérapeutique	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-Pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique des maladies Infectieuses	JEUNE
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie Infantiles	MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE
Histologie et embryologie	DUMONT Louis
Chimie	PERROT
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	PERRIN J.
Clinique de Chirurgie Cardiaque	MICHAUD Pierre
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	X....
Biologie médicale et pharmacodynamie	X....

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Chimie générale pharmaceutique	COLLET
Neuro-chirurgie	MENSUY
Clinique de pédiatrie	SARROUY
Climatologie	LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS
Neuro-chirurgie	LECUIRE
Médecine générale	REVOL
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD
Pharmacie chimique et Pharmacologie	CIER André

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN
Anatomie pathologique	FEROLDI
Physique biologique	MORET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Chimie biologique	MM. CREYSSSEL Roger
Hygiène	THIVOLET
Parasitologie	GARIN
Electro-Radiologie	PINET
Botanique et cryptogamie	ODDOUX
Chimie analytique	de SOLLIERS
Médecine du Travail	TOLOT
Médecine générale	DESPIERRE
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT
Chirurgie générale	DESCOTES
Pathologie expérimentale	JOUVET
Physique biologique	PEYRIN
Anatomie pathologique	TOMMASI
Electro-radiologie	BUFFARD
Médecine générale et thérapeutique	LEJEUNE
Stomatologie	de MOURGUES Françole
Maladies infectieuses	NAUSSAC
Chirurgie générale	REBOUILLAT
Pédiatrie	ROMAGNY
Médecine générale	DELAHAYE J.-P.
Anesthésiologie	DELEUZE R.
Electroradiologie diagnostic et thérapeutique	GIRAUD M.
Anesthésiologie	MICHEL
Pédiatrie et puériculture	FRANCOIS
Chirurgie générale	MICHOULIER
Dermatologie	COLOMB
Médecine générale	LAMBERT
Médecine générale	FRIES
Pédiatrie	GILLY

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie	DUROUX
Thérapeutique	BRETTE
Anatomie	BOUCHET
Hématologie	FAVRE-GILLY
Histologie et embryologie	GIROD
Chimie biologique	GRAS
Chimie analytique	MALLEIN
Hygiène	RIFFAT
Biologie médicale et Pharmacodynamie	FAUCON
Physiologie	FLANDROIS
Bactériologie	VIALIER-RAYNARD

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique	MM. BURTHIAULT
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX
Chirurgie générale	GUILLEMEN
Chirurgie générale	JAUBERT de BEAUJEU
Chirurgie générale	MARION Pierre
Médecine générale	PLAUCHU
Médecine générale	PONT
Chirurgie générale	SAUTOT
Médecine générale	TRAEGER
Médecine générale	VIGNON
Ophtalmologie	BONAMOUR
Médecine légale	COLIN
Dermatologie	COLOMB
Chirurgie générale	de MOURGUES Georges
Médecine générale	DEVIC
Obstétrique	DUMONT Martial
Urologie	DURAND
Chirurgie générale	FRANCILLON
Chirurgie générale	SAUBIER
Neuro-Psychiatrie	SCHOTT
Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Electro-Radiologie	CHASSARD
Orthopédie	FAYSSÉ
Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD
Médecine générale	GARDE
Ophtalmologie	HUGONNIER
Pneumo-phthisiologie	KALB
Médecine générale	LARBRE
Chirurgie générale	MARET
Médecine générale	MORNEX
Médecine générale	NORMAND
Médecine générale	PERRIN André
Pédiatrie et puériculture	BETHENOD
Stomatologie	DUMAS
Médecine générale	FRIES
Obstétrique	GARMIER
Médecine générale	NOEL
Médecine générale	ROBERT
Orthopédie	SCHNEPP

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : M. le Professeur L. REVOL
Assesseurs : MM. les Professeurs : A. BADINAD
A. CIER
R. MALLEIN

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MON PERE

A MONSIEUR SIN THAN ET A SON EPOUSE

A S.A. SISOWATH SOVANNARETH ET A SON EPOUSE

Qu'ils veuillent bien trouver dans ce travail la maigre consolation à ma très longue absence et aux sacrifices qu'ils ont consentis pour que je puisse mener à bien mes études.

A S. A. ROYALE LE PRINCE NORODOM SIHANOUK

Chef de l'Etat du Cambodge

Symbole d'Indépendance et d'Union nationale.

Qu'elle daigne accepter l'humble témoignage de
notre fidèle attachement et de notre profond
respect.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS REVOL

Assesseur de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie à Lyon
Professeur de Pharmacie Galénique
Pharmacien-Chef de l'Hôpital de Vinatier

Il a bien voulu nous accepter dans son laboratoire et suivre avec bienveillance notre travail.

Il nous a toujours accordé son entière confiance en nous laissant libre accès à ses documents et à sa bibliothèque personnelle.

Nous gardons de lui l'image d'un maître toujours bienveillant, infatigable, au savoir illimité et d'esprit critique infaillible.

Qu'il veuille bien accepter l'hommage de notre gratitude et de profond respect.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRÉ BADINAND

*Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique
Biologiste des Hôpitaux*

C'est pour nous un très grand honneur qu'il daigne accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

MONSIEUR LE PHARMACIEN-COLONEL ANDRÉ CIER

*Professeur de Pharmacie Chimique et de Pharmacologie
Directeur au Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
Division Chimie et Pharmacologie*

En tant que Pharmacien militaire, il nous fait un très grand honneur et un immense plaisir en acceptant de juger notre travail.

A travers lui nous présentons notre infinie reconnaissance et nos souvenirs les meilleurs à tous nos Maîtres de l'E. S. S. M.

MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ MALLEIN

*Professeur Agrégé
Pharmacien-Chef de l'Hôpital de l'Antiquaille*

Il a bien voulu s'intéresser à notre travail et nous a fait l'honneur d'accepter d'être notre juge.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de nos sentiments respectueux et reconnaissants.

A MONSIEUR ANDRÉ REVOL

*Assistant chargé des Travaux pratiques à la Faculté
Assistant Biologiste des Hôpitaux*

Il a bien voulu nous confier ce travail qui fait partie de son programme de recherches ; malgré ses multiples occupations, il nous a toujours guidé de ses conseils et nous a fait profiter de son expérience et de son immense savoir.

Si ce travail a pu être mené à bien, c'est grâce à ses conseils et à ses directives.

Il a toujours été pour nous un maître plein de sollicitude, de compréhension et d'esprit critique rigoureux.

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre attachement.

A MADAME ANDRÉ REVOL

Pharmacien, ancienne Interne des Hôpitaux de Lyon

Elle fut pour nous d'une bonté et d'une gentillesse exceptionnelle.

Qu'elle veuille bien accepter notre respectueux hommage.

A MAURICE VELAY

Docteur en Pharmacie

Nous le remercions vivement de son aide.

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE DE GALENIQUE

Auprès duquel nous avons toujours trouvé l'aide et la collaboration en toute amitié.

Nous les assurons de notre reconnaissance et de notre impérissable souvenir.

A TOUS NOS CHEFS
DE L'ECOLE DU SERVICE DE SANTE MILITAIRE

A TOUS NOS MAITRES
DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Ils nous ont toujours encouragé et aidé par leur sollicitude et leur bienveillance, aussi bien pendant l'année scolaire que lors de chaque examen.

Combien il aurait été difficile de nous adapter à leur langue et à leur enseignement scientifique sans cette constante bienveillance.

Leur savoir, leurs qualités d'enseignants sont à la hauteur de la réputation de l'Enseignement français dans le monde.

Nous les prions de croire à notre très grande admiration et à nos sentiments très respectueux.

A TOUS MES AMIS
FRANÇAIS ET CAMBODGIENS

Tous m'ont adopté sans préjugés et toujours avec chaleur dans leur communauté.

C'est auprès d'eux que j'ai trouvé le réconfort et les encouragements durant les dix longues années passées loin des miens.

Cette thèse est une heureuse occasion pour moi de leur exprimer mon infinie reconnaissance et ma sincère amitié.

INTRODUCTION

L'abondance des études consacrées aux corticostéroïdes témoigne de leur importance de plus en plus grande en thérapeutique. Pourtant, l'origine de la corticothérapie est encore bien récente. C'est en 1949 que HENCH (91) révéla les remarquables propriétés anti-inflammatoires de la cortisone dans le traitement de la polyarthrite. Jusqu'à cette date, seule la désoxycorticostérone synthétisée par REICHSTEIN en 1936, avant d'avoir été retrouvée par cet auteur dans la glande surrénale, avait déjà pris place dans l'arsenal thérapeutique. Et encore faut-il distinguer la date de la découverte de HENCH et celle de l'utilisation courante de corticostéroïdes en thérapeutique.

En effet, malgré l'immense espoir et l'enthousiasme suscités par cette découverte, il ne fut pas possible de généraliser rapidement l'usage thérapeutique à cause de la rareté, donc du prix de revient élevé des corticostéroïdes naturels. Les hormones naturelles les premières connues et les plus utilisées sont la cortisone et l'hydrocortisone. Ces hormones naturelles étaient retirées exclusivement des capsules surrénales (zone corticale) où elles s'y trouvent en quantités infimes. Il fallut attendre 1952, l'année où la cortisone fut synthétisée pour la première fois et même 1953, quand FRIED et SABO (75) obtinrent la 9- α -chloro-hydrocortisone, beaucoup plus active que l'hormone naturelle (hydrocortisone), pour que les corticoïdes entrent vraiment dans la thérapeutique courante. Mais, comme pour essayer de rattraper son retard, la corticothérapie va, dans les années qui suivent, se développer d'une façon spectaculaire.

L'assertion, qui veut que le produit naturel soit toujours plus actif que le produit de synthèse, est mise en défaut par la découverte de FRIED et SABO. Dès lors, la chimie de synthèse va fournir

75 FRIED J. J. et E. H. SABO. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2273.
Ibid., 1954, 76, 1455.

91 HENCH P. S., KENDALL E., SLOCUNE C. H., POLLEY H. F. — *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin.*, 1949, 24, 181.

à la corticothérapie des produits non seulement moins coûteux, mais ce qui est encore plus remarquable, possédant une activité biologique anti-inflammatoire plus grande en même temps que les effets secondaires indésirables disparaissent ou s'atténuent dans des proportions importantes.

On assiste alors à une éclosion de nouveaux corticoïdes, bien qu'ils ne soient pas tous retenus par les cliniciens, l'éventail des corticoïdes anti-inflammatoires s'est considérablement élargi et leur production à l'échelle industrielle a entraîné une diminution considérable des prix.

Les molécules retenues possèdent toutes le même squelette que les hormones naturelles : la cortisone et l'hydrocortisone, sur lesquelles viennent se greffer de nouveaux groupements.

— L'introduction d'une double liaison supplémentaire en 1-2 (95) renforce l'activité anti-inflammatoire et diminue légèrement le pouvoir rétionnel du sodium. La prédnisone (Δ -1-cortisone) et la prédnisolone (Δ -1-hydrocortisone) présentent un avantage important sur les hormones naturelles.

— La méthylation en 6- α (29) (30) (160) entraîne une nouvelle augmentation de l'activité anti-inflammatoire.

Les dérivés 6- α -méthyl-prédnisolone et 6- α -méthyl-prédnisone possèdent une activité légèrement plus marquée que la prédnisolone et la prédnisone.

— L'halogénéation en 9- α accroît à la fois l'activité anti-inflammatoire et le pouvoir rétionnel du sodium.

— L'introduction du groupement méthyl en 16- α et β ou d'un oxhydre en 16- α (7) (131) (165) fait disparaître la plus grande partie de leurs propriétés de rétention du sodium, tout en conservant intacte leur activité anti-inflammatoire (Triamcino-lone, Dexaméthasone et Bétaméthasone).

95 HERZOG H. C., NOBILE A. et Coll. — *Science*, 1955, 121, 176.

29 BOWERS A., IBANEZ L. C. et RINGOLD H. J. — *Tetrahedron*, 1959, 7, 138.

30 BOWERS A. and RINGOLD H. J. — *Tetrahedron*, 1958, 3, 14.

160 SPERO G. B., THOMPSON J. L., MAGERLEIN B. J., HANZE A. R., MURRAY H. C., SZBEK O. K. et HOBG J. A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 6213.

131 OLIVETO Z. P. et Coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 4431.

165 STOLAR S. M. et BERSTEIN S. — *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 5036.

— L'introduction d'un second atome de fluor en 6- α de la Triamcinolone donne un produit très actif en applications cutanées (Fluocinolone).

Les modifications tournent donc toujours autour de la molécule initiale naturelle ; à ce point de vue purement chimique, la synthèse de corticoïdes n'a pas donné un résultat aussi heureux que la synthèse des corps à propriétés œstrogéniques. Le fait d'être obligé de passer par la même molécule que celle des hormones naturelles, nécessite une mise en œuvre de moyens d'investigation considérables, car la réalisation synthétique ou plus exactement hémi-synthétique de cette molécule est très laborieuse : l'exemple de la première hémi-synthèse de la cortisone en 1952, qui ne nécessitait pas moins de 40 stades de réactions chimiques fort délicates, illustre bien cette difficulté. Bien que depuis lors on ait découvert des voies d'accès beaucoup plus favorables en partant de produits plus accessibles (78) (174) et en utilisant les processus fermentaires des microorganismes, l'opération reste toujours très onéreuse.

Mais, dans l'enthousiasme provoqué par la découverte de HENCH, la possibilité d'étendre la nature des emplois et le degré d'activité, ont amené les grandes firmes pharmaceutiques à consacrer des sommes énormes à la synthèse de corticoïdes nouveaux.

Dès lors, la corticothérapie prit de l'espace et évolua rapidement, comme l'attestent le développement des centres de recherches et le nombre croissant de publications.

Les stéroïdes prennent dans l'industrie une place très importante. Ils représentent (5) aux U. S. A. une valeur de négoce de 60 milliards de francs en 1958 contre 20 milliards en 1951. VELLUZ estime qu'en 1960, le marché mondial des corticostéroïdes atteint à lui seul une valeur d'au moins 100 milliards de francs. Ces chiffres sont d'ailleurs insuffisants pour exprimer l'allure des productions, car il faut tenir compte, au cours de cette période, de réductions considérables dans le coût des produits. Ainsi, le prix de l'hydrocortisone est de 100 000 anciens francs le gramme en 1947, il est passé à 1 100 anciens francs en 1964, c'est-à-dire environ 90 fois moins. Les quantités de produits atteignent ainsi

78 FRIGOT Pierre. — *Produits pharmaceutiques Fr.*, 1961, 16, 379-399.

174 VELLUZ Léon. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, 18, 104-5, 229-244.

5 ANONYME. — *Chem. Eng. News*, 1959, 37, n° 5, p. 23.

plusieurs dizaines de tonnes par an. La production française en 1960 était d'environ 10 tonnes pour les seuls corticoïdes anti-inflammatoires.

Parallèlement à l'augmentation de la production et à la connaissance de plus en plus approfondie des divers aspects des activités de ces molécules, le domaine des applications thérapeutiques s'est considérablement élargi. Outre la maladie rhumatismale, qui occupe une place de choix, bien d'autres maladies sont justiciables de l'emploi des corticoïdes, telles l'insuffisance surrénalienne, les hémopathies, les dermatoses, les manifestations allergiques, certaines affections pulmonaires, les maladies oculaires et de nombreuses autres affections. En même temps, les formes pharmaceutiques se sont multipliées ; en effet, les corticoïdes sont représentés dans toutes les formes galéniques.

Cette vogue des corticoïdes, si elle satisfait les chercheurs, inquiète les pharmacologues ; en effet, les propriétés biologiques de ces molécules sont à double tranchant ; leur emploi peut apporter au malade une amélioration sensationnelle, mais aussi entraîner des perturbations inattendues et redoutables. Ainsi, l'action freinatrice hypophysaire peut être bénéfique au malade, mais l'aplasie du cortex surrénal risque d'être définitive. La diminution de la réaction inflammatoire soulage le patient, mais supprime en même temps les signes d'alarme normaux de défense de l'organisme. D'autre part, la plus grande partie du mécanisme d'action des corticoïdes reste encore mystérieuse. Leurs activités thérapeutiques sont le plus souvent mises en évidence par le clinicien avant que le pharmacologue n'en découvre le mécanisme. La plupart des effets secondaires sont imprévisibles au laboratoire et ne peuvent être décelés qu'au cours de la thérapeutique.

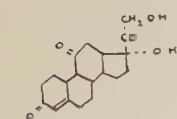
Malgré ces obstacles, le développement de la corticothérapie demeure spectaculaire, et, ainsi que le dit VELLUZ, dans son article sur le développement contemporain des corticoïdes : « On serait tenté de ne pas le croire, après qu'une période de temps aussi courte ait déjà valu une telle progression, mais il faut se rendre à l'évidence que la recherche stéroïdienne ne révèle dans aucun pays le moindre signe de défaillance. Bien au contraire, la chimie des cortisones se développe avec fièvre ».

CHAPITRE PREMIER

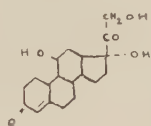
RAPPEL CONCERNANT LA STRUCTURE DES STEROIDES UTILISES EN THERAPEUTIQUE

Qu'il nous soit permis, par souci de clarté, de rappeler les structures de deux hormones naturelles, la cortisone et l'hydrocortisone, et de quelques hormones corticoïdes synthétiques.

LES PRINCIPALES HORMONES NATURELLES

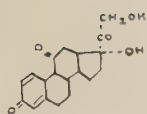


Cortisone

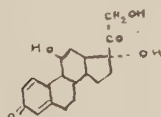


Hydrocortisone

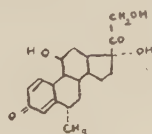
LES PRINCIPALES HORMONES DE SYNTHESE



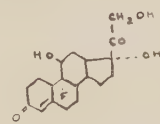
Prednisone



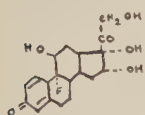
Prednisolone



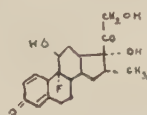
6α-Méthyl - prednisolone



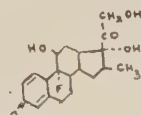
9α - Fluorohydrocortisone



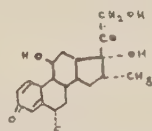
Triamcinolone



Dexaméthasone

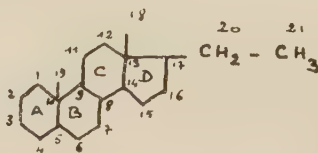


Bétaméthasone



Para - méthasone

Ces corticostéroïdes possèdent en effet un squelette commun à 21 atomes de carbone dérivé du carbure de Diels : le prégnane.



Ce noyau est porteur de divers substituants, les uns caractéristiques des hormones naturelles et retrouvés chez tous les corps de synthèse, les autres caractéristiques de chacun de ces derniers :

— Les groupements communs comprennent :

- 1) Le groupement 17 α - 21 - dihydroxy 20 - cétostéroïde ;
- 2) Le groupement Δ - 4 - 3 - cétostéroïde du noyau A ;
- 3) Le groupement 11 céto ou 11 hydroxy-stéroïde.

— Les modifications apportées aux hormones naturelles sont représentées par :

- Une double liaison supplémentaire en 1-2 du noyau A ;
- L'halogénéation (chlore et fluor) en 9 α et en 6 α .
- La méthylation en 6 β et en 16 α et β .
- L'hydroxylation en 16 α .
- L'estérification par divers acides de la fonction alcool en 21.

Les méthodes d'analyse de ces molécules naturelles ou artificielles utilisent des réactions chimiques communes à toutes les molécules ou des réactions spécifiques à tel ou tel groupement caractéristique d'une fonction ou d'une particularité structurale.

Comme les corticoïdes ne parviennent pas à l'état pur à l'analyste, on conçoit que l'analyse qualitative ou quantitative d'un corticoïde doit être précédée d'une purification par fractionnement et qu'ensuite seulement on ait recours à des réactions chimiques qui prennent alors toute leur valeur,

CHAPITRE II

FORMES PHARMACEUTIQUES DES STEROIDES : COMPRIMES

En thérapeutique, les corticoïdes sont utilisés aussi bien par voie générale qu'en applications locales. Cette diversité d'emploi a amené l'industrie pharmaceutique à présenter les corticoïdes sous presque toutes les formes médicamenteuses.

Pourtant, les problèmes qui se présentent aux pharmaciens galénistes sont nombreux et notamment si l'on désire une présentation injectable. Les formes libres, telles la cortisone, l'hydrocortisone, la prédnisone, la prédnisolone, etc... sont, au sens pharmaceutique du mot, insolubles dans l'eau et leur solubilité dans l'huile est nettement insuffisante pour préparer des solutés dont les concentrations soient adaptées à la thérapeutique, ce qui explique le succès passager des suspensions de micro-cristaux.

Aussi, pour obtenir des solutés injectables, eut-on recours à des esters de di- ou poly-acides qui sont hydrosolubles. Mais là encore, on se heurte à la faible stabilité de ces corps en solution, nécessitant des précautions particulières, telle l'utilisation de tampons ou d'adjuvants stabilisants et la présentation des produits sous forme lyophilisée.

Aussi, quand on veut utiliser la voie générale, s'adresse-t-on souvent à la forme « comprimé », facile à obtenir, à conserver, à utiliser.

Cette forme est très répandue en corticothérapie anti-inflammatoire. Plus de 20 sortes de comprimés spécialisés de corticoïdes figurent au dictionnaire Vidal en 1964.

Si certains ouvrages officiels, tels le Formulaire pharmaceutique des Services de Santé des Armées, la Pharmacopée française, la Pharmacopée helvétique, la Pharmacopée belge, etc...

ne les mentionnent pas encore, par contre les Pharmacopées de langue anglaise, le B. P. 1963 et l'U. S. P. XVI, de même que la Pharmacopée internationale, leur consacrent des monographies avec description des modalités d'extraction, de contrôle, de dosage.

Une étude sommaire d'une liste des comprimés spécialisés de corticoïdes utilisés en France et à l'étranger appelle les remarques suivantes :

1) Les corticoïdes les plus employés en comprimés possèdent un hydroxyle en 21, soit libre, soit estérifié sous forme d'acétate. Il s'agit de corticoïdes non hydro-solubles. Depuis peu, quelques esters hydro-solubles (hémisuccinate de sodium, di-phosphate de sodium et métrasulfobenzoate de sodium) entrent dans la fabrication de quelques comprimés ;

2) La variété des dosages des comprimés de diverses natures traduit leurs différences d'activité anti-inflammatoire ; ainsi, les hormones naturelles, hydrocortisone et cortisone, figurent aux doses de 5 mg, de 25 mg et même 100 mg ; alors que les corticoïdes de synthèse sont présentés sous forme de comprimés à dose réduite : 0,1 mg et 0,5 mg par unité pour la dexaméthasone et la bétaméthazone, 1 mg et 4 mg pour la triamcinolone, 1 mg et 5 mg pour la prédnisone et la prédnisolone.

Préparation des comprimés de corticoïdes.

Il ne semble pas exister de difficultés particulières dans l'art de confectionner les comprimés de corticoïde, tous les excipients employés pour les comprimés en général peuvent être utilisés.

Cependant, il est nécessaire d'attirer l'attention sur quelques points. L'excipient doit être exempt de composés à réaction alcaline, exempt aussi d'oxydants, afin de ne faire courir aucun risque d'altération au groupement α -cétoïque.

Il faut également éviter l'emploi de certaines substances acides au sens de LEWIS, telles que l'isopropoxyde d'aluminium ou le trifluorure de bore, qui peuvent faire subir un homo-réarrangement du cycle D.

Evidemment, dans un comprimé, milieu parfaitement sec, il y a peu de chance pour que l'altération des corticoïdes se fasse d'une façon aussi importante qu'en milieu liquide, mais on a pu

remarquer, au cours d'une mise au point de formule, que le principe actif sensible pouvait, malgré son insolubilité dans l'eau et une préparation à sec, entrer en réaction avec un élément de l'excipient, de réaction ionique mal adaptée.

Les meilleurs excipients sont donc en principe des substances inertes sèches non hygroscopiques ou des substances servant de tampon ou même certains acides organiques.

On comprend qu'il faille parfois tâtonner pour atteindre un mode de fabrication approprié.

On a souvent recours à la dessiccation sous pression réduite, à la granulation à sec ; COLLARD (52) préconise une granulation à une température comprise entre 40 et 45° C.

S'il s'agit de corticostéroïdes inaltérables en milieu aqueux, on peut les utiliser sous forme micronisée pour préparer un lait homogène au moyen d'alcool de concentration comprise entre 30° à 50°. Sur une partie aliquote du mélange des poudres constituant la charge, on fait absorber le lait de corticostéroïde, on obtient une poudre légèrement humide que l'on homogénéise par plusieurs tamisages, on sèche à l'étuve ; on ajoute le restant de l'excipient et on granule.

La fin de la fabrication s'effectue selon le procédé classique.

Naturellement, la faible concentration de principe actif de chaque comprimé (0,5 mg et même 0,1 mg pour certains) pose des problèmes de répartition. On peut à la rigueur s'en tenir à la technique habituelle consistant en un mélange soigneux et suivi de plusieurs tamisages, mais actuellement, pour atteindre une plus grande sécurité, on s'attache en premier lieu à obtenir des cristaux de corticoïdes les plus fins ; ceci est réalisé grâce à un microbroyage ou à une cristallisation en milieu aqueux.

Enfin, il existe un problème qui nous ramène à la nature même de l'excipient : ce problème nous est posé par l'effet ulcérigène de l'emploi prolongé des comprimés de corticoïdes. On a donné plusieurs explications aux mécanismes possibles de cet ulcère peptique, action générale ou action locale (hyper-sécrétion de pepsine et d'acide chlorydrique, diminution de mucus

protecteur (108') (52) (88). Aussi a-t-on proposé d'incorporer dans le mélange des substances anti-acides ou bien d'enrober les comprimés dans une couche d'anti-acide (52) (16). Malheureusement, si on protège la muqueuse gastrique, on risque aussi d'altérer le produit actif.

La diversité des excipients utilisés intéresse l'analyste. Ces excipients compliquent le contrôle des produits actifs, comme on le verra dans le chapitre réservé à l'extraction des principes actifs des comprimés.

108' LECHAT P. — Pharmacodynamie des stéroïdes. Journées Pharm. Fr., 1961.

88 GREY et Coll. — *J. Am. Med. Assoc.*, 1951, 147, 1529.

16 BARBER M. et DELAUNAY A. — *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1951, 18, 193.

CHAPITRE III

LA SEPARATION ET L'ANALYSE DES STEROIDES APPLICATIONS AU CONTROLE DES STEROIDES DANS LES COMPRIMES

L'extraction et la séparation des stéroïdes sont des préliminaires indispensables à l'identification et au dosage. D'une part, le stéroïde se trouve en quantité minime, dispersé dans une masse considérable de matières de natures variées, si le milieu est sec, cette gangue ne réagit théoriquement pas sur le stéroïde, mais si l'extraction n'est pas convenablement conduite, sa fragilité lui fait courir le risque d'une altération. D'autre part, le stéroïde peut ne pas avoir été utilisé pur, mais encore souillé d'analogues structuraux ou de corps voisins formés au cours de la synthèse, ou bien des transformations structurales peuvent apparaître au cours de la conservation. Il est donc nécessaire d'extraire et de séparer électivement : ce double but est réalisé par la technique chromatographique, c'est à elle qu'ont recours les Pharmacopées américaine et anglaise pour le contrôle de pureté des corticoïdes.

LA SEPARATION DES CORTICOIDES : TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

L'application de la technique chromatographique sur papier, découverte en 1944 par CONSDEN, GORDON et MARTIN (53) à l'analyse des stéroïdes, rencontra beaucoup de difficultés à cause de leur lipophilie. On parvint cependant à séparer par chromatographie certains stéroïdes après les avoir convertis en dérivés

53 CONSDEN R., GORDON A. H. et MARTIN A. J. — *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.

solubles, mais ce genre de technique se révéla peu pratique à l'usage.

Ce n'est que depuis l'introduction des systèmes spéciaux de solvants, d'une part par ZAFFARONI, BURTON et KEUTMAN (190), d'autre part par BUSH (37) et la mise au point de nombreuses variantes, que les stéroïdes sont devenus accessibles à la chromatographie sur papier.

Cette technique simple, efficace et extrêmement sensible, s'est développée d'une façon prodigieuse et actuellement, on peut dire qu'elle est applicable à toutes les classes de stéroïdes et son emploi est non seulement qualitatif, mais aussi quantitatif et même préparatif.

Pour mémoire, on rappellera que la chromatographie est basée sur les coefficients de partage d'une substance entre deux ou plusieurs solvants non miscibles. Ce sont MARTIN, SYNGE et CONSDEN (115) (114) (53) (178) qui eurent l'idée de fixer la phase aqueuse (phase stationnaire) sur un support inerte (poudre, gels, papier), que parcourt un autre solvant (phase mobile) ; ici, le papier fait à la fois office de support cellulosique et de phase stationnaire aqueuse. Au cours de l'écoulement, le solvant mobile entraîne les différentes substances à des vitesses qui dépendent de leur coefficient de partage respectif ; plus la solubilité d'un corps dans la phase mobile par rapport à sa solubilité dans la phase stationnaire est grande, plus la migration est rapide.

La migration d'une substance est désignée par les signes suivants :

$$R_F = \frac{\text{distance de la ligne de départ au centre de la tache}}{\text{distance de la ligne de départ au front du solvant}}$$

Mais il est souvent plus juste de rapporter la migration d'une substance à celle d'une substance de référence. Cette expression permet d'éliminer les erreurs dues aux variations de migration d'un solvant liées à une mauvaise saturation de la cuve, à des variations de température et elle devient indispensable lorsqu'on

190 ZAFFARONI A., BURTON R.B., et KEUTMANN. — *Science*, 1950, 111, 6.

37 BUSH I.E. — *Biochem. J.*, 1952, 50, 370-378.

114 MARTIN A.J., SYNGE R.L.R. — *Biochem. J.*, 1941, 35, 91.

115 *Ibid.*, p. 1358.

178 VON M. et ZSCH F.A. — *Ang. Chem.*, 1956, 68, 313.

laisse écouler, comme c'est fréquemment le cas en chromatographie des stéroïdes, la phase mobile à l'extrémité inférieure de la feuille. Le stéroïde de référence est choisi en fonction à la fois du système de solvant employé et de la classe du stéroïde étudié. On définit alors la constante de migration du stéroïde par des lettres :

$$R_E \quad R_{DOC} \quad R_S \quad R_{ST}$$

dans lesquelles E = cortisone ; S = composé S ; ST = stéroïde témoin ; DOC = desoxycorticostérone.

On obtient ainsi une constante de mobilité relative par rapport à celle du corps de référence. Pour obtenir une mesure directe de la migration (cm/heure), on exprime la mobilité du corps étudié par le RT (SAVARD (150)).

$$R_T = \frac{\text{distance de la ligne de départ au centre de la substance}}{\text{distance de la ligne de départ au centre de la substance de référence}} \times k$$

Le signe k correspond à la migration (cm/heure) de la substance standard de référence.

La valeur R_T permet d'éliminer le caractère relatif du résultat puisqu'il est indépendant de la nature des stéroïdes de référence. C'est une constante caractéristique du corps étudié du même type que le R_F .

I. — Techniques de chromatographie sur papier des stéroïdes.

a) *Chromatographie descendante.*

La chromatographie descendante, procédé de MARTIN et coll., est encore actuellement la plus utilisée dans l'analyse des stéroïdes. C'est une technique facile à réaliser, mais dont la mise en œuvre doit être soumise à quelques impératifs rigoureusement fixés d'avance.

En principe, les R_F , R_{ST} , R_T ne dépendent que des caractéristiques structurales de la substance, mais il ne faut pas perdre de vue que la technique chromatographique est née d'observations empiriques, et la pratique montre que la nature du support (physique et chimique), la température d'ambiance,

le débit du flux du solvant mobile, etc..., peuvent influencer d'une façon importante la migration du solvant et de la substance.

Avant de mettre en œuvre une chromatographie, il faut s'assurer que la température de la pièce ne varie pas de $\pm 0,5^{\circ}$ C, que la qualité du papier est bien adaptée ; que les solvants sont très purs et enfin, que la cuve est hermétiquement fermée.

Avant de procéder à la migration, il faut réaliser une saturation de la cuve en vapeur de solvant. Ceci est obtenu en disposant au fond de la cuve des récipients contenant l'une et l'autre phase ou même le mélange pendant un temps minimum déterminé. La cuve étant équilibrée à la température voulue, on introduit le papier chargé de stéroïdes, on referme le couvercle et on laisse le papier s'équilibrer à son tour (de 2 à 5 heures).

On introduit enfin la phase mobile par l'orifice du couvercle et on referme ensuite.

Systèmes de solvants. — Un très grand nombre de systèmes de solvants ont été décrits et sur le plan théorique le nombre de combinaisons possibles est illimité. Mais en pratique, les variations gravitent toujours autour de 2 types de systèmes :

- 1) Système de solvants type Zaffaroni ;
- 2) Système de solvants type Bush.

1) Systèmes du type Zaffaroni.

Les systèmes de solvants du type Zaffaroni sont caractérisés par :

- Une phase stationnaire peu volatile.
- Une phase éluante constituée par un mélange de solvants organiques anhydres.
- Le papier est préalablement imprégné par la phase stationnaire avant de procéder au dépôt de la substance.

Nous reproduisons ci-après le tableau de récapitulation des différents systèmes du type Zaffaroni (126).

126 NEHER R., cité par E. LEDERER. — *Chromatographie en Chim. Organique et Biologique*, Ed. Masson, Paris, 1959.

Système de solvants type Zaffaroni (192)

PHASE STATIONNAIRE <i>Imprégnation du papier</i>	PHASE MOBILE <i>saturée de phase stationnaire</i>
Propylène-glycol Propylène-glycol-eau Propylène-glycol-éthylène-glycol. Ethylène-glycol - Décaline. Cellosolve (éther monoéthylique d'éthylène glycol). Phénylcellosolve (éther mono-phénylique d'éthylène-glycol). Butanédiol - 1 - 3. Glycérol. Formamide. Alcool benzylique. Eau.	Hexane, cyclohexane. Méthyl cyclohexane. Ether de pétrole, ligroïne. Benzène, benzène-cyclohexane, benzène chloroforme. Xylène-méthyléthylcétone, chlorure de méthylène. Chloroforme. Chloroforme-tétrahydrofuranne. Acétone. Méthyl-éthyl-cétone. Butanol, alcool amylique.

Ces systèmes judicieusement sélectionnés sont susceptibles d'être utilisés pour toutes les classes de stéroïdes ; on peut combiner à volonté l'utilisation des deux phases à condition qu'elles ne soient pas miscibles l'une l'autre en toutes proportions.

Les phases stationnaires les plus utilisées sont les glycols, propylène-glycol, éthylène-glycol, et la formamide.

La technique d'imprégnation du papier est très importante, car la quantité de la phase stationnaire retenue par le papier dépend de la rapidité de l'opération. En général, pour diminuer la quantité de la phase stationnaire, on la dilue dans du méthanol ou dans de l'acétone pour obtenir des concentrations de 20 à 70 % parce que la migration est trop lente quand on imprègne le papier avec la phase stationnaire pure.

D'autre part, il est nécessaire de standardiser les délais requis pour déposer les extraits afin d'éviter l'évaporation trop importante de la phase stationnaire et surtout son hydratation.

Avantages et inconvénients des systèmes de solvants type Zaffaroni :

— On peut porter à l'actif de ces systèmes, la grande variété de leurs combinaisons qui sont susceptibles de convenir à toutes

192 ZAFFARONI A. — *Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press N-Y., 1953, XIII, 51.

les classes de stéroïdes ; leur relative insensibilité aux écarts de température ; enfin les possibilités qu'ils offrent en chromatographie préparative.

— Par contre, s'inscrivent au passif : leur migration souvent lente, la nécessité de sécher le chromatogramme à température souvent élevée (80-90°) pendant une heure, et plus généralement la difficulté de ce séchage et de l'élimination du solvant stationnaire demeurant sur le papier peut gêner les réactions d'identification ou contaminer les éluats.

2) Les systèmes de solvant du type Bush.

Ces systèmes sont basés sur l'emploi de solvants non miscibles, mais dont les phases ont été préalablement équilibrées. La phase stationnaire est polaire et volatile.

Le solvant stationnaire, le plus polaire, sature le papier par ses vapeurs. A cet effet, on suspend les feuilles de papier chargées de stéroïdes dans la cuve maintenue à 34-37° et saturée ainsi de vapeurs des deux phases mobile et stationnaire ; on laisse l'équilibre s'établir (2-5 heures).

La chromatographie dans divers systèmes type Bush est cependant possible à la température ordinaire.

On développe ensuite le chromatogramme à l'aide de la phase mobile de polarité plus faible introduite par le sommet de la cuve.

Systèmes du type Bush de polarité croissante de haut en bas (39) (100)

Ether de pétrole-méthanol-eau	: (100 : 96 : 4) : (100 : 85 : 15) : (100 : 80 : 20) : (100 : 70 : 30)
Ether de pétrole-toluène-méthanol-eau	: (25 : 25 : 25 : 15) = B ¹ : (33 : 17 : 30 : 20) = B ₂ : : (33 : 17 : 40 : 10) = B ₃
Ether de pétrole-benzène-méthanol-eau	: (100 : 75 : 25) = B ₄
Toluène-méthanol-eau	: (100 : 50 : 50) : (100 : 55 : 45)

39 BUSH I. E. — *Recent Progress in Hormone Research*, Acad. Press. (N-Y), 1954, IX, 21.

100 JAYLE M. F. — *Analyse des stéroïdes hormonaux*. Ed. Masson, Paris, 1961, t. II, p. 144.

Benzène-méthanol-eau	: (100 : 50 : 50)	= B ₃
	: (100 : 40 : 60)	
	: (90 : 10 : 50 : 50)	= C
Toluène-acétale d'éthyle-méthanol-eau	: (66 : 33 : 50 : 50)	
Benzène-chloroforme-méthanol-eau	: (50 : 50 : 50 : 50)	
	: (100 : 85 : 15)	
Xylène-méthanol-eau	: (100 : 70 : 30)	

Les phases stationnaires sont représentées par :

- méthanol-eau,
- butanol tertiaire-eau.

Avantages et inconvénients des systèmes type Bush.

— Les principaux avantages des systèmes du type Bush sont d'abord les grandes possibilités qu'ils offrent pour la séparation des stéroïdes, mais comme le souligne BUSH (40), ce sont les stéroïdes polaires qui sont les mieux séparés. Si, d'autre part, leur efficacité est supérieure quand on les utilise à des températures égales ou supérieures à 30° C, ils peuvent être cependant employés à température ordinaire.

La migration est, en général, assez rapide : on peut donc prendre directement le R_F, car on arrête la migration du front des solvants au bas de la feuille.

Le séchage du chromatogramme est aisé, il se fait à la température du laboratoire.

Enfin, on évite les inconvénients liés à l'emploi d'une phase stationnaire (propanediol, formamide...) qui, dans la technique de Zaffaroni, contamine les éluats obtenus à partir du chromatogramme.

— Les inconvénients majeurs sont : l'extrême sensibilité aux écarts de température, la nécessité d'équilibrer exactement la phase, la faible capacité de résolution du système.

b) Chromatographie ascendante (53) (178).

La chromatographie ascendante couramment employée pour les autres substances, est très peu utilisée pour la séparation des stéroïdes.

40 BUSH I. E. — *Ibid.*, 1954, IX, 21.

La migration s'effectue verticalement de bas en haut, le mouvement du solvant étant dû exclusivement à la capillarité.

L'appareillage est simple et donne de bons résultats pour les substances dont les R_F sont très différents. Au contraire, la séparation des substances dont les R_F sont faibles et très voisins, comme c'est le cas pour la plupart des stéroïdes, exigerait une prolongation de chromatographie qui est techniquement non réalisable.

c) *Chromatographie horizontale* (101) (54).

La chromatographie circulaire ou radiale n'est pas utilisée dans le domaine des stéroïdes. On emploie la chromatographie horizontale, les chromatogrammes sont placés horizontalement dans des cuves plates qui ont l'avantage de pouvoir se mettre les unes sur les autres.

II. — **Chromatographie en couches minces.**

L'analyse qualitative emploie de plus en plus la technique chromatographique en couches minces. Cette méthode, introduite en 1951 par KIRCHER et coll. (107), est perfectionnée par REISMA et normalisée par STAHL.

Le point particulier de la technique réside dans l'utilisation de plaques adsorbantes en couches minces comme support : le développement se fait par une migration ascendante.

1° *Préparation des chromatoplaques.*

On confectionne des plaques avec des appareils simples et peu coûteux qu'on trouve actuellement dans le commerce avec un mode d'emploi bien détaillé. On peut même les obtenir par pulvérisation de la suspension d'adsorbants sur des plaques de verre à l'aide de simples pulvérisateurs (106).

Les adsorbants les plus utilisés sont l'acide silicique (silicagel), l'oxyde d'aluminium, de Kieselguhr, la poudre de polyamide, la terre silicée, la poudre de cellulose, le magnésol (silicate hydraté de magnésium), etc...

101 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 139.

54 COX R. I. — *J. Clin. Invest.*, 1957, 36, 1726.

107 KIRCHNER J. G., MILLER J. M. et KELLER G. J. — *Anal. Chem.*, 1951, 23, 420.

106 KATSURA, MORITA, FUJIKOHARUTA. — *J. of Chromato.*, 1963, 12, 412.

2° *Propriétés fondamentales des chromatoplaques.*

Les trois propriétés définies par E. STAHL (161) auxquelles doivent répondre les couches siliciques de 0,25 cm d'épaisseur et activées à 105° pendant 30 minutes sont :

a) *Pouvoir séparateur et degré d'activité.*

En développant avec de l'hexane, le chromatogramme d'un mélange de 3 colorants (bleu d'indophénol, rouge de Soudan G, p-diméthylaminoazobenzène (2 µg de chaque), ceux-ci doivent rester à leur point de départ (situé à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque plongeant de 0,5 cm dans le solvant). L'essai est terminé lorsque le solvant est à 10 cm ou au-dessus de la ligne de départ.

En répétant le même essai avec du benzène, on doit observer une migration et une séparation parfaite des 3 colorants.

Le degré d'activité exact de la plaque peut être chiffré par la valeur des R_F des colorants.

Dans le cas des corticostéroïdes on utilise comme référence, le mélange de prédnisone, prédnisolone, méthyl testostérone et cholestérol dans une solution de 0,05 % dans un mélange à égal volume de chloroforme et d'alcool. La phase mobile est constituée par du chloroforme, de l'acétone et de l'acide acétique glacial (75 : 20 : 5).

b) *Propriétés capillaires.*

Le temps mis par le benzène pour couvrir un trajet ascendant de 10 cm sur la couche adsorbante dans des conditions normales de la chromatographie, ne doit pas être supérieur à 45 minutes (30 minutes habituellement).

c) *Structure physique et résistance mécanique.*

L'adsorbant doit posséder un degré granulométrique qui permet l'obtention de couches régulières et d'apparence lisse. Ces couches doivent pouvoir supporter une forte pulvérisation d'acides concentrés suivie d'un chauffage à température élevée (120° C).

3° *Choix du solvant.*

En général, le choix du solvant est réalisé sur les bases exposées pour la chromatographie d'adsorption, c'est-à-dire en

accordant la polarité de l'éluant à celle du mélange à séparer. On s'adressera donc à la série dite éluotrope pour effectuer un premier choix. Une détermination plus précise du meilleur solvant peut ensuite être faite par la microtechnique de STAHL (161).

On dépose sur la plaque plusieurs gouttes espacées d'un mélange séparé, on laisse évaporer le solvant, on dépose ensuite, au centre de chacune des taches, un fin tube capillaire rempli de solvant à examiner, chaque tache subit un développement très rapide sous forme de stries concentriques et l'examen de séparation des composants du mélange permet d'effectuer un choix.

4° *Les avantages de la méthode sont de trois ordres :*

— Economie, le matériel est peu coûteux, le solvant est utilisé en faible quantité.

— Rapidité : la rapidité de réalisation est plus grande qu'en chromatographie sur papier (20 à 40 minutes) ; JACEK VAEDTKE et coll. la réalisent en 3-7 minutes (99).

— Sensible : la grande sensibilité de la méthode permet d'opérer sur des quantités minimales de substances (1 à 5 gammas). Enfin, l'utilisation d'adsorbants inorganiques permet d'employer, pour la révélation, des réactifs corrosifs, tels les acides minéraux.

5° *Inconvénients.*

Pour obtenir des résultats les plus reproductibles, il est nécessaire de prendre de grandes précautions expérimentales souvent difficiles à respecter entièrement ; par exemple, la manipulation des plaques à l'abri total de l'humidité atmosphérique, il faut utiliser des cuves idéalement conditionnées pour le développement.

Dans les conditions les meilleures, les R_F sont constants à $\pm 0,05$ près.

161 STAHL E. — *Chem. Ztg*, 1958, 82, 323.

99 VAEDTKE Jacek, GAJEWSKA Anna et CZARNOLKA Anna. — *J. Chromato.*, 1963, 12, 208.

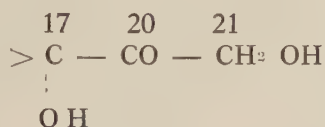
CHAPITRE IV

IDENTIFICATION ET DOSAGE DES CORTICO-STEROIDES

A. — Revue des principales réactions utilisées dans l'analyse des corticostéroïdes.

1° REACTIONS DUES A LA CHAÎNE LATÉRALE :

17 α , 21 dihydroxy 20-cétostéroïdes



a) Les réactifs utilisés pour la caractérisation ou le dosage des stéroïdes qui mettent à profit les *propriétés réductrices* du groupement α -cétoïque de la chaîne latérale sont très nombreux. Parmi les plus courants, on peut citer :

— Le nitrate d'argent ammoniacal.

— Le mercuri-iodure de potassium en solution alcaline (121) (144).

— Le réactif périodo-argentique (135), la réaction n'est positive que si la fonction alcoolique en 21 est libre.

— Le cupritartrate de potassium (32).

— Le phthalate d'aniline (26), ce réactif est identique à celui qui est utilisé pour la mise en évidence des sucres réducteurs.

121 MONDER C. et WHITE A. — *Endocrinology*, 1951, 68, 159-63.

144 PRO PHARMACOPOEA. — *Notes techniques*, 26 et 27.

135 PATHOLOGIE ET BIOLOGIE. — (*Sem. des Hôpitaux*) : Archives de Biologie médicale, n° 2, mars 1957.

32 BRITISH PHARMACOPOEA. — Monographies consacrées aux corticostéroïdes (1963).

26 BODANSKY A., KOLLONISTH. — *Nature*, 1961, 13, 61-63.

— Les réactifs aux sels molybdiques sont utilisés par plusieurs auteurs : TALBOT et coll. (168) préconisent le réactif à l'arséno-molybdate de cuivre, réactif de NELSON (127). G. SCHWARZ (152) emploie le réactif arséno-molybdique pour la détection et la détermination de quelques stéroïdes en chromatographie sur papier.

— L'acide phospho-molybdique (90) est également utilisé pour la détection des cortico-stéroïdes, mais la réaction n'est pas spécifique du groupement α -cétoïque, elle est également donnée par d'autres groupements réducteurs de la molécule, en particulier le groupement insaturé du noyau A.

— Le réactif acéto-molybdique (180) n'est réduit qu'en présence du groupement α -cétoïque libre ; cette réaction est applicable au dosage des corticoïdes.

— Le réactif de Hagedorn et Jansen est utilisé par GORDON et PELLY (84) pour la détermination de la désoxycorticostérone et son acétate. Les propriétés réductrices du groupement α -cétoïque s'exercent également vis-à-vis de la para-nitroso-diméthylaniline. PESEZ et ROBIN (136) (138) (176) emploient ce réactif pour le dosage sélectif de la corticostérone. La p-nitroso-diméthylaniline est réduite, en milieu alcalin et à 0° en N-méthyl-p-phénylène-diamine qui, condensée avec le phénol en présence de ferricyanure de potassium, conduit à la N-diméthyl-amino-phényl-quinone-imine présentant une coloration bleue dont le maximum d'absorption est à 650 m μ .

Le pouvoir réducteur diffère peu d'un stéroïde à l'autre, à l'exception de la triamcinolone plus active. Mais la vitesse de la réduction varie notablement avec les divers substituants : l'hydroxyle en 17 est favorable, de même que la substitution en 11 par un carbonyle. Par contre, la fluoration en 9- α n'apporte pas de modification. L'estérification de la fonction alcoolique

-
- 168 TALBOT N. B., SALTZMANN A. H., WISONE R. C. et WOLFE J. K. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 535.
127 NELSON N. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 153, 375.
152 SCHWARZ V. — *Biochem. J.*, 1953, 53, 148.
90 HEARD R. D. H. et SOBEL H. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 165, 519.
180 WACHSMUTH H., VAN KOEKHOVEN L. — *Anal. Chim. Acta*, 1960, 22, 41-49.
136 PESEZ M., ROBIN J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, 17, 624-26.
138 PESEZ M. — *Lyon Pharmaceutique*, 1963, 8, 378-9.
176 VERDIER J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, 18, 795-799,

en 21 fournit des résultats variables. Les esters hexa-hydro-benzoïques, méta ou para sulfo-benzoïques et hémisucciniques réagissent plus lentement et la réduction devient très lente avec l'ester tri-méthyl acétique et pratiquement nulle avec les phosphates, les hexa-hydro-ortho-phtalates et les sulfates.

— L'ortho-dinitrobenzène, également réactif des sucres, développe une réaction violette en milieu alcalin, avec les 17- α -cétol-stéroïdes. Le mécanisme de la réaction ferait intervenir une structure quinoïde, forme pseudo-acide dont les sels sont colorés (25) (70) (136).

Mais, de toutes les réactions mettant en évidence le pouvoir réducteur de la chaîne α -cétol, celles qui sont basées sur la réduction des sels de tétrazolium, sont les plus employées. La réaction des sels de tétrazolium conduit, par ouverture du noyau tétrazol, à des formazanes de coloration variée.

Ces réactifs ont été utilisés soit pour la détection des corticoïdes réducteurs en chromatographie sur papier, soit pour leur dosage (96) (35).

Le chlorure de 2, 3, 5 triphényl tétrazolium (T. P. T. Z) fournit un formazane rouge dont le maximum d'absorption est à 480 m μ (13) (130) (191).

— Le chlorure de 3, 3' dianisole -4, 4' -(3, 5 diphényl) tétrazolium, bleu de tétrazolium, donne une formazane de coloration violet sombre dont l'absorption maximum se situe à 510 m μ (36) (46) (111) (130). Cette réaction est très employée pour la détection et le dosage des corticostéroïdes.

— Le chlorure de 2, 5 diphényl -3 (p. iodophényl)-tétrazolium donne un formazane dont le maximum d'absorption est à 495 m μ (46) .

-
- 25 BLOCK R.J. et BOLLING D. — *J. Biol. Chem.*, 1939, 129, 1.
70 FEARON W.R. et BOGGUST W.A. — *Analyst*, 1954, 79, 101.
96 HOFMANN H. et STAUDINGER H. — *Bioch. J.*, 1951, 322, 230.
35 BURTON R. B., ZAFFARONI A. et KEUTMANN E. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 188, 763.
13 BANES D.-J. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1950, 39, 37.
130 NOWACZYNSKI W., GOLDNER M., GENEST J. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 45, 818-821.
191 ZAFFARONI A., BURTON R. B., KEUTMANN E. H. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 109-116.
36 BUSH I. E., GALE M. M. — *Analyst*, 1958, 89, 532-36.
46 CHEN P.-S., WHERLER C. J. et TEWEELL H. E. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, 42, 749.
111 MADER W. J. et BUCK R. R. — *Anal. Chem.*, 1952, 24, 666.

— Le chlorure de 2- (p-iodo-phényl)-3 (p-nitro-phényl-5-phényl) tétrazolium donne une coloration avec un maximum d'absorption 480 m μ (93).

La réaction de dosage avec les sels de tétrazolium est délicate en ce sens qu'il faut se conformer strictement aux conditions opératoires données par les auteurs ; quand les conditions de basicité, de température, de temps de contact sont modifiées, le groupement α - β insaturé du noyau A, peut les réduire également (46) (120). De plus, il faut s'assurer que le milieu réactionnel ne contient pas d'autres substances réductrices, tels que les sucres, l'acide ascorbique, substances qui peuvent se trouver associées aux stéroïdes dans des formes pharmaceutiques.

b) *Réaction de Porter et Silber.* — Les réactions qu'on vient de voir ne dépendent que du seul groupement α -cétolique. Par contre, celle de Porter et Silber est liée à la présence supplémentaire en 17 d'un hydroxyle tertiaire. Les 17-désoxystéroïdes (désoxy-corticostérone, aldostérone) possédant en 20 et 21 le même groupement α -cétolique ne donnent pas la réaction de Porter et Silber, aussi, a-t-on considéré cette dernière comme spécifique des stéroïdes possédant le groupement 17- α , 21 dihydroxy-20 cétostéroïde.

C'est en 1950 que PORTER et SILBER (143) ont décrit la réaction qui porte leurs noms, les stéroïdes possédant dans leur chaîne latérale le groupement 17 α , 21 -diol 20-one donnent une coloration jaune dont le maximum d'absorption se situe à 410 m μ , lorsqu'ils sont chauffés en milieu sulfurique en présence de chlorhydrate de phényl-hydrazine.

— Le mécanisme de la réaction demeure discuté : MATTOX et coll. (118) ont obtenu la même réaction avec le 3-21-diacétoxy- Δ -16 prégène-11, 20-dione. Ceci suggère que la production de la coloration jaune se fait par déshydratation de la fonction alcoolique en 17 avec création d'une double liaison en 16-17. D'autre part, la triamcinolone donne une réaction peu positive avec le réactif de PORTER et SILBER, ce qui met en évi-

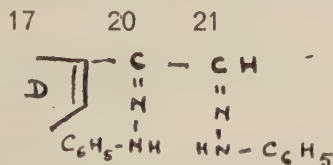
93 HENLY A. A. — *Nature*, 1952, 169, 877.

120 MEYER A. S., LINDBERG M. C. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 813-17.

143 PORTER C. C., SILBER R. H. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 201-7.

118 MATTOX V. R., MASON H. L. et ALBERT A. — *Proc. Staff. Meeting Mayo Clin.*, 1953, 28, 569.

dence l'influence de la substitution en 16. WALSER et SCHLINKE (182) apportent l'explication suivante : lorsque la réaction est positive, il y aurait formation d'une bis-hydrazone insaturée dans le cycle D par déshydratation entre l'hydroxyle en 17 et le groupe méthylène en 16.



Avec la triamcinolone, la déshydratation est suivie d'une émolisation rendant impossible la création ultérieure de la double liaison, leur conclusion est donc conforme au mécanisme proposé par MATTOX et coll. PESEZ admet le principe de cette explication, mais pense que ce mécanisme est sans doute plus subtil, car il n'a pas obtenu la coloration attendue avec les dérivés ne possédant pas le méthyle angulaire en 18, comme la 18-norcortisone. On peut cependant avancer qu'avec ces dérivés, il n'est pas possible de former en 16-17 la double liaison (140).

c) *Réactions indirectes par oxydation de la chaîne latérale.* — La scission oxydative de la chaîne latérale α -cétole des 17-hydroxy corticostéroïdes précédée ou non d'une réduction de la fonction cétone en 20 par un réactif approprié (boro-hydrure de sodium) (146) (179) constitue un élégant moyen d'étude des stéroïdes. Les agents oxydants les plus employés sont : les périodates (41) (133), le bismuthate de sodium (92) (129) (146) (153), l'anhydride chromique (119). Le clivage de la chaîne α -cétole donne naissance à du formaldéhyde ou à de l'acide formique d'une part, à un 17-cétostéroïde ou à un acide étiénique correspondant d'autre part.

- 182 WALSER A., SCHLINKE H.P. — *Experientia*, 1959, 15, 71.
 140 PESEZ M. et ROBIN J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 1930.
 146 REVOL A., BURLET J.M., TISSOT A., PUTELAT R., BADINAND A., GUINET P. — *Rev. Lyon Med.*, 1959, 8, 949-968.
 179 VONE A.R.X., NEHER R. — *Helv. Chim. Acta*, 1956, 39, 1664-70.
 41 BUSH I.E. — *Biochem. J.*, 1955, 59, XV.
 133 PAN S.C., LASKIN A.P. et PRINCIPE P. — *J. of Chromatography*, 1962, 8, n° 2, 32-36.
 92 HELLER M., STOLAR S.H. et BERNSTEIN S. — *J. Org. Chem.*, 1962, 27, 328.
 129 NORYMBERSKI J.K. — *Nature*, 1952, 170, 1074-75.
 153 SCHRIEFERS H., KORUS W. — *Z. Physiol. Chem.*, 1958, 313, 6676.
 119 MENINI E. et NORYMBERSKI J.K. — *Biochem. J. London*, 1962, 84, n° 1, 195-201.

Il reste à détecter ou à déterminer les corps formés, soit le formaldéhyde (46) (133), soit le 17-cétostéroïde par la réaction spécifique de ZIMMERMANN (146), soit encore à révéler l'acide étiénique (voir aussi le chapitre consacré à la révélation chromatographique).

2° REACTIONS DUES AU GROUPEMENT INSATURE DU NOYAU A.

— Les stéroïdes possédant sur le noyau A une double liaison en α , β du groupement oxo présentent un certain nombre de réactions communes et spécifiques. L'existence d'une double liaison supplémentaire en 1-2 peut modifier sensiblement la réactivité du groupement Δ -4-3 cétostéroïde (12).

Absorption ultra-violette.

— L'absorption ultra-violette due à la présence d'une double liaison α , β du groupement oxo du noyau A fournit une méthode très simple de détection et de détermination des corticoïdes (85) (164).

La double liaison en position conjuguée avec le groupement carbonyle du noyau A produit un système chromophore, dont le maximum d'absorption est entre 230 à 270 m μ pour les Δ 1,4-3 cétostéroïdes ; les Δ 4-3 cétostéroïdes ont un maximum d'absorption aux environs de 240 m μ (62).

La mesure de la densité optique est faite soit dans l'alcool éthylique absolu, soit dans l'alcool méthylique absolu.

Le carbonyle du groupement Δ 4-3 cétostéroïde fournit également des combinaisons avec les hydrazides.

Les hydrazidones formés avec l'hydrazide salicylique absorbent fortement dans la région ultra-violette et permettent le dosage des stéroïdes (47).

12 BADINAND A. et REVOL A. — Conférence de la Société Techniques Pharmaceutiques, 1961.

62 DORFMAN L. — *Chem. Revs.*, 1953, 53, 47.

47 CHEN P. S. — *Anal. Chem.*, 1959, 31, 292-6.

HØYER (98) avait observé que les hydrazones produites par la cortisone et les delta-4-3 céstéroïdes avec le réactif T de Girard (82) ont un maximum d'absorption à 285 m μ dans un tampon phosphate à pH 7, et ce maximum passe à 264 m μ par addition d'acide chlorhydrique ; cette réaction a été utilisée pour le dosage du Δ -4-3 céstéroïde dans l'urine.

Mais la plus intéressante de ces réactions est celle qui utilise comme réactif l'hydrazide de l'acide isonicotinique.

Cette réaction a été décrite par UMBERGER en 1955 (173) ; elle a été appliquée par SMITH et FOELL (157) pour la différenciation des Δ 1,4-3 céstéroïdes. CINGOLANI et coll. (48) (50) l'ont utilisée pour le dosage des corticoïdes dans les préparations pharmaceutiques. BADINAND A., MALLEIN R., REVOL A. et LECHEVIN J.-C. (11), l'ont appliquée aux dosages de l'aldostérone. La formation d'hydrazidone est sensible et spécifique. Elle permet la détection des Δ 1,4-3 céto et des Δ 4-3 céstéroïdes sur chromatogrammes en couches minces ou sur papier. On obtient dans les deux cas la même coloration, mais les Δ 1,4-3 céstéroïdes ne réagissent pas immédiatement et exigent un réactif plus concentré.

En solution méthanolique, milieu généralement utilisé pour le dosage, les Δ -4-3 céstéroïdes réagissent avec le réactif à l'I. N. H. à 0,1 % ; la coloration jaune obtenue atteint son maximum d'intensité au bout d'une heure à 25° C et présente un maximum d'absorption à 380 m μ . Les Δ -1,4-3 céstéroïdes ne réagissent qu'avec un réactif plus concentré, c'est-à-dire contenant un excès d'hydrazide de l'acide isonicotinique. La coloration jaune atteint son maximum d'intensité au bout de 3 heures à 25° C et à un maximum d'absorption à 405 m μ .

3° REACTIONS EMPLOYANT LES REACTIFS GENERAUX DU GROUPEMENT CARBONYLE.

EVANS et GILLAM (68) avaient observé que les cétones saturées et α - β insaturées donnent des thiosemicarbazones, dont

-
- 98 HØYER G., SCAND. — *J. Clin. and Lab. Invest.*, 1951, 3, 303.
82 GIRAD A. et G. SANDULESCO. — *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1095.
173 UMBERGER E. J. — *Annal. Chem.*, 1955, 27, 768-773.
157 SMITH L. L., FOELL T. — *Anal. Chem.*, 1959, 31, 102-105.
48 CINGOLANI E., GAUDIANO A. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1957, 12, 467-473.
50 CINGOLANI E., CAVINA G. et AMORMINO V. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, n° 5, 301-310.
11 BADINAND A., MALLEIN R., REVOL A., LECHEVIN J.-C. — Congrès Soc. Pharmacie, Toulouse, 1961.
68 EVANS L. K. et GILLAM A. Z. — *J. Chem. Soc.*, 1943, p. 565.

le maximum d'absorption peut être déterminé en présence de thio-semicarbazides en excès.

BUSH (38) utilisait cette réaction pour le dosage des céto-stéroïdes saturés et α , β insaturés. Les Δ -4-3 céto-stéroïdes donnent des thiosemicarbazones dont le maximum d'absorption se situe entre 299-301 m μ (E max entre 35, 600-42, 500). Les Δ -1-3 céto, Δ -16-20 céto et 20 céto-stéroïdes saturés ont un maximum d'absorption entre 272-274 m μ (E max : 25 000 à 26 000).

— Les 17-céto-stéroïdes donnent des thiosemicarbazones à absorption maxima entre 269-271 m μ (E max 25 000-30 000).

TALBOT et coll. (169) ont confirmé ces données en utilisant cette réaction pour le dosage des Δ -4-3 céto-stéroïdes dans l'urine.

Les semicarbazones ont été également utilisés par JANSEN (105) pour le dosage de la prédnisone et de la prédnisolone dans les comprimés. La coloration obtenue a un maximum d'absorption entre 290- et 300 m μ .

— La dinitro-2-4-phényl hydrazine réagit avec les groupements cétoniques des stéroïdes pour donner des hydrazones présentant des colorations allant du jaune à l'orange.

— Les Δ -4-3-céto-stéroïdes donnent des 2,4 dinitrophényl hydrazones dont le maximum d'absorption dans le chloroforme est à 390 m μ . Les céto-stéroïdes saturés donnent des dérivés à maximum d'absorption entre 367-369 m μ (61).

Dans les mêmes conditions, le carbonyle en 11 n'intervient que très faiblement.

Quant au carbonyle en 20, il agit en donnant un dérivé dont le maximum d'absorption en milieu alcalin est compris entre 495 et 500 m μ .

La réaction est sensible, mais elle n'est pas spécifique, par exemple, la cortisone donne un dérivé dont le maximum d'absorp-

169 TALBOT N.B., ULICK S., KOUFREIANOW A. et ZYGUMUNTOWICZ. — *J. Clin. Endocrinol. et Metabolism.*, 1955, 15, 301.

105 JENSEN J.B. — *Dansk. T. Farm.*, 1956, 30, 293-301.

61 DJERASSI C. et RYAN E. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1000.

tion est de 475 m μ , qui est à mi-chemin entre le maximum des dérivés donnés par des groupements 3-céto et 20 céto-stéroïdes.

— BARTHOS a étudié (21) d'une façon très complète la réaction à l'ionol (2,6-diterbutyl-p-crésol). On sait que les cétones cycliques forment par condensation un complexe avec les phénols. SCHULZ et NEUSSE (153) ont observé que les Δ -4-3 céto-stéroïdes, cortisone, hydrocortisone et stéroïdes voisins donnent par condensation avec le 2,6 diterbutyl-p-crésol des dérivés colorés après un temps déterminé d'agitation à l'air. BARTHOS, par addition d'un agent oxydant au milieu réactionnel, obtient une réaction positive dans un temps plus court ; en poursuivant ces études, l'auteur a pu dégager les particularités suivantes :

— la coloration obtenue, liée à la présence d'une double liaison en 4-5, et si le carbone 11 est hydroxylé ou non substitué, est bleu et a un maximum d'absorption à 610 m μ ; la coloration est jaune brun (Maximum d'absorption à 460 m μ) si le carbonyle est présent en 11. Les 3 céto-stéroïdes saturés développent une coloration rose à maximum d'absorption 500 m μ ;

— les Δ 1,4-3 céto-stéroïdes donnent les mêmes colorations, la réaction est moins sensible. Les 3 stéroïdes insaturés en 1-2, mais saturés en 4-5 ne réagissent pas. Les substituants en 17 sont sans influence sur la réaction ; au contraire, la présence d'un substituant sur le carbone 6 d'un Δ 4-3 céto-stéroïde empêche la réaction.

BARTOS admet enfin que les colorations observées avec les 3-céto-stéroïdes ne sont pas dues à la formation du complexe avec le 2,6 diterbutyl-p-crésol, mais à une condensation avec un dérivé d'oxydation de ce phénol.

— En milieu acétique, les aldéhydes réagissent avec le p-diméthyl-amino-aniline en donnant des imines fortement colorées.

PESEZ et BARTHOS (137) (138) ont constaté que les 4-3 céto-stéroïdes, à la différence des cétones simples, réagissent aussi bien avec le p-diméthyl-amino-aniline en milieu perchloro-méthano-

21 BARTOS J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, 17, 141.
137 PESEZ M. et BARTOS J. — *Talanta*, 1960, 5, 216.

lique. Les substituants sur les cycles B, C et D sont sans influence sur l'intensité de la coloration ; mais celle-ci diminue fortement si on apporte des modifications au cycle A. La présence d'une double liaison conjuguée au carbonyle est indispensable, ainsi avec les 3 - cétostéroïdes saturés, la réaction est négative.

— En 1946, DREYWOOD a montré que l'anthrone est un réactif très sensible pour la détection des hydrates de carbone. SATTLER et ZERBONN avaient postulé une formation initiale du furfural pour que la réaction soit positive ; appliquée aux stéroïdes ayant une chaîne cétole sur le carbone 17, ils obtinrent un chromogène ayant un maximum d'absorption à 620 m μ ; mais c'est en pratiquant les réactions systématiques sur 16 échantillons stéroïdes qu'on a montré que seuls les Δ -4-3 cétostéroïdes non substitués en 11 donnent une coloration qui obéit à la loi de BEER et qui a un maximum d'absorption à 600 m μ .

4° REACTIONS D'HALOCHROMIE.

De nombreuses colorations ou fluorescences se développent en milieu acide minéral concentré, ou en milieu acide anhydre et disparaissent par simple dilution aqueuse : ce caractère définit l'halochromie et l'halofluorie. Les réactifs mis en œuvre ne participent généralement pas à la formation des dérivés mais provoquent des phénomènes de mésomérie au niveau de doubles liaisons initialement présentes ou formées par déshydratation.

En série stéroïde, ces réactions particulières ont reçu de nombreuses applications. « L'apparition et l'intensité de la couleur ou de la fluorescence sont liées aussi bien à l'existence d'une fonction ou d'un arrangement qu'à la position de ceux-ci dans la structure » (139).

Ce sont WINTERSTEINER et PFIFFER (185) qui ont observé que les stéroïdes fournissent avec l'acide sulfurique concentré des chromogènes. L'étude du spectre d'absorption de ces chromogènes a été faite par ZAFFARONI (189), puis par BERNSTEIN et LENHARD (23), qui ont réalisé une étude systématique portant sur quelques 220 stéroïdes. Chaque stéroïde possède un ou plu-

139 PESEZ M., POIRIER P. — *Méthodes et réactions de l'analyse organique*, Ed. Masson, t. III, p. 227.

185 WINTERSTEINER O., PFIFFER J. J. — *J. Biol. Chem.*, 1936, 116, 291.

189 ZAFFARONI A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 3828.

23 BERNSTEIN S. et LENHARD R. H. — *J. Org. Chem.*, 1953, 18, 1146.

sieurs maxima d'absorption qui varient d'un composé à l'autre en liaison avec les substituants ; ce maxima obéit à la loi de BEER et peut donc servir à un dosage.

Les Δ -4-3 cétostéroïdes produisent un chromogène dont le maximum d'absorption est compris entre 279 et 299 m μ .

— SMITH et MULLER (158) ont déterminé les spectres d'absorption de quelques 1-déhydrostéroïdes dans l'acide sulfurique. Les fluorescences vertes fournies par quelques corticostéroïdes, corticostérone, hydrocortisone, paraissent liées à la présence d'un hydroxyle en position 11. On n'observe pas d'halofluorie avec la 11-désoxycorticostérone, ni avec la cortisone, qui est carbonylée en 11.

— L'acide phosphorique (125), le trichlorure d'antimoine, l'acide para-tuolène sulfonique (178) sont également utilisés pour révéler les chromatogrammes sur papier ou en couches minces. La coloration est décelée sous l'excitation des radiations U. V. (365 m μ).

— La prédnisolone, à la différence de la prédnisone, fournit, soit avec le réactif acéto-sulfurique (178), soit avec le réactif acide sulfurique-chlorure ferrique, une réaction colorée qui permet son dosage dans les préparations pharmaceutiques (24).

Les Δ -3-4 cétostéroïdes donnent, par chauffage avec un alcali organique ou minéral, un chromogène possédant un maximum d'absorption compris entre 373 et 375 m μ . CROSS et coll. (55) ont utilisé cette réaction pour la détermination quantitative de l'acétate de cortisone.

— BUSH (37) a détecté les Δ -4-3 cétostéroïdes en chromatographie sur papier par la fluorescence jaune produite par le chauffage du papier après pulvérisation avec de la soude en solution méthanolique.

— ABELSON et BONDY (1) ont présenté un procédé de fluorométrie pour la détermination des Δ -3-4 cétostéroïdes en traitant ces derniers par le réactif au butylate de potassium.

158 SMITH L. L., MULLER W. H. — *J. Org. Chem.*, 1959, 31, 1539-1542.

125 NEHER R. et WETTSTEIN A. — *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 2278-85.

24 BERSTEIN S. et LENHARD R. H. — *J. Org. Chem.*, 1954, 19, 1269.

55 CROSS, EISSEN et KEDERSHA R. G. — *Anal. Chem.*, 1952, 24, 1649.

1 ABELSON D. et BONDY K. — *Arch. Biochem. et Biophys.*, 1955, 57, 208.

REACTIONS DIFFERENTIELLES DES 11-CETO ET DES 11-HYDROXY-STEROIDES.

— On admet que l'oxygène fonctionnel porté par le carbone 11 de la molécule stéroïde est très peu réactif, particulièrement quand cet oxygène est sous la forme carbonyle. Cependant, la nature de cet oxygène peut, avec certains réactifs, permettre de distinguer les 11 cétostéroïdes type cortisone des 11-hydroxy stéroïdes type hydrocortisone.

CLARK (51) a décrit une réaction avec la diphénylamine : les stéroïdes du type cortisone donnent une coloration violette dont le maximum d'absorption est à 530 m μ , alors qu'avec les 11-hydroxy-stéroïdes, la zone d'absorption maxima est comprise entre 630 et 650 m μ . Ce procédé permet donc de différencier les 11-cétostéroïdes des 11-hydroxy-stéroïdes et même leur dosage dans un mélange.

— Alors qu'il est peu de réactions qui caractérisent le groupement 11-cétostéroïde, au contraire un assez grand nombre permettent de caractériser le groupement 11-hydroxy-stéroïde, ce sont surtout des réactions d'halochromie.

WINDERSTEINER et PFIFFER (185), ZAFFARONI (189), BERSTEIN et LENHARD (24), ont montré que l'addition d'acide sulfurique concentré à l'hydrocortisone, produit un chromogène dont le maximum d'absorption est 415 m μ .

BANES (14) utilise comme réactif le mélange acide sulfurique - acide acétique glacial (20 : 80) pour doser l'hydrocortisone dans l'extrait surrénal. SZACKOWSKI, O'BRIEN et MADER (167), utilisent un mélange d'acide sulfurique - acide acétique (6 : 4). SWEAT (166) emploie le mélange acide sulfurique - éthanol (10 : 1). GOLDZICHER, BODENCHUK et NOLAN (83) emploient le mélange acide sulfurique à 90 % - éthanol (5 : 1).

51 CLARK P. — *Nature*, 1955, 175, 123.

14 BANES D.-J. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1953, 42, 669.

167 SZACKOWSKI C. R., O'BRIEN M. G. et MADER W. J. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 944.

166 SWEAT M. C. — *Anal. Chem.*, 1953, 26, 773.

83 GOLDZICHER J. W., J. M. BODENCHUK et NOLAN. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 853.

Les pages précédentes nous ont montré une disproportion marquée entre le petit nombre des groupements actifs de la molécule des corticostéroïdes et l'abondance des réactions analytiques proposées : simple traduction de leur insuffisante spécificité, mais aussi témoignage de l'intérêt porté à l'analyse des corticoïdes.

Le classement des réactions suivant la réactivité des groupements actifs est didactique, il se révèle également très commode en pratique. On verra dans le chapitre « points de fragilité de la molécule des stéroïdes » que l'un des groupements de la molécule peut être altéré d'une façon importante, sans que les autres groupements subissent une destruction même minime ; dans ce cas, si la mise en œuvre d'une réaction de contrôle ne concerne que le groupement qui n'est pas touché, on risque de commettre une erreur importante.

De là, une conclusion pratique : pour contrôler qualitativement une forme galénique à base de stéroïde, il faut pratiquer au moins une réaction caractéristique de chaque groupement réactif ; à cette condition, on peut s'assurer en toute tranquillité de l'identité du produit.

B. — Applications des réactions analytiques à la révélation des stéroïdes sur les chromatogrammes.

De nombreux procédés et réactions ont été décrits et utilisés pour la révélation des stéroïdes sur les chromatogrammes ; il existe même des réactions spécifiques de chacun des groupements actifs de la molécule, dont l'utilisation permet de préciser la structure moléculaire de chaque stéroïde séparé en divers points du chromatogramme.

Le, ou les réactifs utilisés, sont en général des liquides ; on doit alors tremper le chromatogramme (sur papier) ou projeter le réactif par pulvérisation (chromatogramme sur papier ou en couches minces). Cette opération, en apparence très simple, doit être menée de telle sorte que le, ou les stéroïdes, ne puissent pas

être déplacés par capillarité soit pendant l'imprégnation du chromatogramme, soit au cours du séchage de ce dernier.

Les techniques et les réactifs les plus utilisés dans le domaine de la chromatographie sur papier et en couches minces sont :

1° PROCÉDES UTILISANT LA PROPRIÉTÉ D'ABSORPTION DES RAYONS ULTRA-VIOLETS PAR LES STÉROÏDES INSATURÉS.

La propriété d'absorber des rayons de courte longueur d'onde (aux environs de 270 m μ) par des stéroïdes insaturés est bien connue ; cette propriété, déjà utilisée pour le dosage de ces derniers permet, d'une façon très simple, de les révéler sur chromatogrammes. Le simple examen en lumière ultra-violette à courte longueur d'onde (230 - 270 m μ) des chromatogrammes sur papier et, dans certains cas, des chromatogrammes en couches minces, lorsque l'absorbant est additionné de substances fluorescentes, permet de repérer et éventuellement de photographier le spot (85) (164), ce dernier se présente sous forme d'une tache bleu-sombre sur un fond violet. La limite de la sensibilité est d'environ 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, c'est donc une méthode très sensible, mais la spécificité est faible, tous les stéroïdes insaturés et de nombreuses impuretés donnent les spots de même coloration. Néanmoins, le procédé est des plus pratiques et rend de grands services. En outre, le chromatogramme, après examen en lumière ultra-violette à 255 m μ environ, peut être encore révélé à l'aide de différents réactifs chimiques, à condition que le temps d'exposition ne soit pas trop long, l'irradiation risque en effet de modifier la structure des stéroïdes, surtout lorsqu'il s'agit des Δ 1,4-3 cétostéroïdes.

2° TECHNIQUES UTILISANT LE RÉACTIF ALCALIN.

BUSCH (37) a décrit une fluorescence jaune donnée par les Δ -4-3 cétostéroïdes observée en lumière de Wood (environ 360 m μ), après qu'ils aient été chauffés en milieu sodique.

-
- 85 GORNALL A. G., MAC DONALD M. P. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 279-97.
164 STICH K., ROTZLERE REICHSTEINT. — *Helv. Chim. Acta*, 1959, 42, 1480-1502.

En chromatographie, on utilise une solution aqueuse ou éthanolique de Na OH N, le chromatogramme est imprégné par cette solution, on le laisse sécher (10 à 60 minutes), à la température du laboratoire, puis on le place à l'étuve à 80-90° C pendant 15 minutes. On observe alors la fluorescence en lumière de Wood.

3° DETECTION PAR LE REACTIF A L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE ISONICOTINIQUE (102).

UMBERGER (173) a décrit 2 réactifs à l'hydrazide de l'acide isonicotinique.

a) *Un réactif faible* qui est une solution éthanolique à 0,5 mg/ml permet de révéler les Δ -4-3 cétostéroïdes. Le chromatogramme est pulvérisé avec ce réactif et après 20 minutes à la température du laboratoire, on observe une fluorescence jaune sous lumière de Wood. Les Δ -1,4-3 cétostéroïdes ne donnent pas de fluorescence.

b) *Un réactif fort*, qui est une solution méthanolique à 4 mg/ml réagit presque instantanément avec les Δ -4-3 cétostéroïdes en donnant une coloration visible, même à l'œil nu.

Les Δ 1,4-3 cétostéroïdes ne réagissent que très tardivement (30-45 minutes).

4° TECHNIQUES DE REVELATION UTILISANT LES SELS DE TETRAZOLIUM.

Les trois techniques précédemment décrites sont basées sur la propriété du groupement Δ -4-3 cétostéroïdes du noyau A. Les procédés suivants utilisent, au contraire, la propriété réductrice de la chaîne latérale 17 α , 21 di-hydroxy-20 cétone. Cette propriété réductrice a permis la mise au point de très nombreuses réactions (voir chapitre analytique) ; parmi celles-ci, seules les réactions utilisant les sels de tétrazolium seront citées.

a) *La réaction au chlorure de triphényl tétrazolium.*

Réactifs :

A - Solution aqueuse à 0,2 p. 100 (p/v) de T. P. T. Z ;

B - Na OH 5 N dans le méthanol à 60 p. 100.

102 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 184.

Au moment de l'emploi, on mélange deux parties de réactif A avec une partie de réactif B. L'imprégnation se fait en plongeant la bande dans le mélange ; on laisse ensuite la bande sécher à la température du laboratoire. Les taches roses révélant le groupement α -cétolique apparaissent presque instantanément (104).

b) *La réaction au bleu de tétrazolium.*

Les spots sont ici en bleu sombre. Les Δ -3-4 cétostéroïdes réagissent immédiatement, les Δ 1,4-3 cétostéroïdes ne réagissent que plus tardivement (30-45 minutes).

5° TECHNIQUES DE REVELATION PAR DES REACTIONS INDIRECTES.

Ici, on utilise non pas la propriété réductrice de la chaîne latérale, mais la possibilité de scinder cette chaîne, transformant ainsi le stéroïde initial en dérivés nouveaux qu'on identifie.

Une particularité de cette méthode est qu'elle permet non seulement de détecter un stéroïde, mais éventuellement d'étudier sa structure moléculaire.

La pratique de cette méthode comporte deux opérations distinctes, une première pulvérisation est faite avec un réactif oxydant approprié qui oxyde sélectivement la chaîne 17 α -21-diol 20-one. Après un temps de contact variable suivant les techniques, on fait une deuxième pulvérisation avec un réactif spécifique du, ou des produits formés, ces produits peuvent être un stéroïde : 17 cétostéroïdes ou acides étiéniques correspondants ou une substance non stéroïde : formaldéhyde, acétaldéhyde, acide formique.

A. — *Méthodes d'oxydation.*

Les réactifs utilisés varient d'un auteur à l'autre, mais l'opération est toujours la même, c'est-à-dire se fait par pulvérisation.

a) *Méthode de Romanoff* (103) (149).

Le réactif oxydant est une solution à 1 p. 100 d'acide périodique ou de périodate de sodium dans une solution aqueuse de

104 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 185.

103 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 188.

149 RAMONOFF E. B., HUNT C. A. — *Endocrinology*, 1955, 57, 499.

tétraméthyl ammonium à 1 p. 100. L'oxydation transforme le 17-21-dihydroxy 20-cétostéroïde en 17 cétostéroïde correspondant qu'on met en évidence dans une deuxième opération par la réaction de Zimmermann.

b) *Méthode de Bush (41).*

BUSH utilise 2 réactifs oxydants, soit une solution à 1 p. 100 (p/v) d'acide périodique dans une solution à 65 p. 100 d'éthanol et d'acide sulfurique 0,4 N, soit une solution à 0,4 p. 100 de tétra-acétate de plomb dans l'acide acétique glacial.

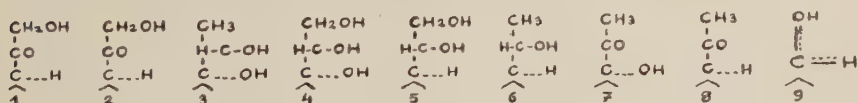
Le principe de la méthode est le même que celle de Romanoff, l'oxydation des 17-21-dihydroxy 20-cétostéroïdes donne naissance aux 17-cétostéroïdes qu'on mettra en évidence dans un deuxième temps.

c) *Méthode de Lew-Bart et Mattox (110).*

LEW-BART et MATTOX utilisent comme réactif oxydant une solution méthanolique d'acétate de cuivre qui oxyde les 17-hydroxy-cétol et les 17-désoxy-cétol en donnant des dérivés du type glyoxal, qu'on mettra en évidence par le réactif de Porter et Silber.

d) *Méthode d'Axelrod (9) (103).*

La méthode d'AXELROD est surtout utilisée pour préciser la nature de la chaîne latérale des stéroïdes. Les chaînes latérales pouvant être mises en évidence par cette méthode sont :



Les réactifs oxydants sont :

— *L'acide périodique*, en solution à 3 p. 100 dans du méthanol à 50 p. 100, transforme les chaînes 3 et 4 en 17 cétostéroïdes.

— *L'acide chromique*, sous forme d'une solution à 0,4 p. 100 de tri-oxyde de chrome dans l'acide acétique à 90 p. 100 transforme les chaînes 2, 3, 4, 9 en 17 cétostéroïdes.

110 LEW BART M. L. et MATTOX W. R. — *Anal. Chem.*, 1961, 33, 559.

9 AXELROD L. R. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 1308.

— *Le tétra-acétate de plomb*, en solution saturée dans un mélange d'acide acétique glacial - anhydride acétique (19 : 1) oxyde le groupe méthyle en 21 des 21 - désoxy-corticostéroïdes en fonction alcool primaire. Il transforme ainsi les chaînes 7 et 8 en α -céto ; il en est de même des chaînes 3 et 6 après oxydation en carbonyle de la fonction alcoolique en 20.

— *L'anhydride chromique*, sous forme d'une solution à 0,2 p. 100 de bioxyde de chrome dans l'anhydride acétique, convertit les chaînes 4 et 5 en α -céto.

— *L'isopropylate d'aluminium*, en solution à 1 p. 100 dans un mélange de toluène-cyclohexane (v/v), transforme les stéroïdes du type n° 9 en 17 - C. S. (voir ci-contre).

B. — *Méthodes de mise en évidence des produits d'oxydation de la chaîne latérale.*

La deuxième opération de la méthode consiste à mettre en évidence les produits apparus après l'oxydation ; ces produits sont, soit des stéroïdes transformés, soit des produits non stéroïdes provenant de la scission de la chaîne latérale.

a) *Les dérivés stéroïdes peuvent être des 17 céto-stéroïdes, ou des dérivés du type glyoxal ou encore des acides étiéniques correspondants.*

1° *Mise en évidence des 17 céto-stéroïdes.*

Les 17 - céto-stéroïdes sont mis en évidence par la *réaction de Zimmermann*. Cette réaction est donc utilisée à la fois dans la méthode de ROMANOFF, dans celle de BUSH et dans plusieurs des méthodes d'AXELROD (la première, la 2^e et la 5^e). Le protocole de cette réaction sera décrit dans la partie expérimentale.

2° *Mise en évidence des dérivés du type glyoxal.*

Dans la méthode de LEW-BART et MATTOX, on utilise comme révélateur une solution à 0,5 mg/ml de chlorhydrate de phénylhydrazine dans l'acide sulfurique à 70 p. 100. Au moment de l'emploi, on mélange 2 parties de ce réactif avec une partie d'alcool à 95°. Les 17 - 21 dihydroxy 20 - céto-stéroïdes non oxydés, donnent des taches jaunes au bout de 2 à 3 heures. Les 17 - hydroxy-céto et les 17 - désoxy-céto donnent après oxydation des dérivés du type glyoxal qui réagissent très rapidement avec le réactif révélateur.

3° Mise en évidence des acides étiéniques.

Les acides étiéniques seront révélés grâce aux réactifs spécifiques du groupement carboxylique.

— On peut utiliser le réactif indicateur de pH, telle la solution de pourpre de bromocrésol (10) ou encore la solution de rouge de phénol et de tris-hydroxyméthyl-amino-méthane (le mode d'emploi en sera indiqué plus loin). AXELROD et PULLIDER utilisent encore le réactif au chlorure de thionyle pour révéler le groupement carboxylique des acides étiéniques (10).

Les réactifs sont :

1. - chlorure de thionyle pur.
2. - solution saturée de chlorure d'hydroxylamine dans l'alcool à 95°.
3. - solution de soude caustique à 5 p. 100 dans l'alcool à 95°.
4. - solution à 10 p. 100 d'acide chlorydrique concentré dans l'alcool à 90°.
5. - solution à 5 p. 100 de chlorure ferrique dans l'alcool à 95°.

La réaction peut être pratiquée soit sur verre de montre, soit sur le chromatogramme : dans ce cas, on immerge la bande de papier dans le chlorure de thionyle et on la place sur une plaque de verre, on chauffe doucement jusqu'à évaporation complète du réactif. La bande est ensuite plongée dans la solution de chlorure d'hydroxylamine qui a été amenée juste avant l'emploi à un pH compris entre 8,6 et 9,4, puis chauffée comme précédemment à 85 - 100° C jusqu'à ce qu'elle soit sèche ; enfin, la bande est immergée dans la solution de chlorure ferrique qui a été acidifiée à pH 1.

— La présence des acides carboxyliques se traduit par une coloration violette immédiate sur un fond jaune brillant.

b) *Les dérivés non stéroïdes formés à partir de la chaîne latérale* peuvent être soit du formaldéhyde, soit de l'acétaldéhyde, soit encore de l'acide formique.

10 AXELROD L. R. and PULLIDER J. E. — *Anal. Chem.*, 1960, 32, 1200-1202.

1° Révélation de l'acétaldéhyde (134).

De 3 à 7 minutes après la pulvérisation avec le réactif oxydant, on fait une deuxième pulvérisation avec la solution suivante :

— Nitroprussiate de sodium	2 g
— Pipéridine	15 ml
— Alcool méthylique	100 ml

10 à 15 minutes après, l'acétaldéhyde est révélé en un spot bleu sur fond jaune paille ; l'exposition du papier aux vapeurs d'ammoniac intensifie la coloration bleue.

2° Révélation de l'acide formique (71).

La révélation de l'acide formique, dérivé de la chaîne 17 α , 21 - diol 20 - one sur un chromatogramme, se fait par trois pulvérisations successives.

La première avec une solution aqueuse à 1 % de Hg Cl₂.

La deuxième avec une solution concentrée de :

— acide acétique	1 ml
— acétate de sodium	1 g
— eau q. s. q.	100 ml

Elle est suivie d'un chauffage à sec à l'étuve à 100°.

La troisième utilise de l'ammoniac à 7,5 N.

La présence d'acide formique se traduit par une tache noire. La sensibilité de la réaction est d'environ 5 γ /cm².

3° Révélation du formaldéhyde.

Cette réaction, qui met en évidence la destruction de la chaîne 17 - 21 - diol 20 - one par action des oxydants par des agents alcalins, sera développée dans la partie pratique.

134 PAN S. C. — *J. of. Chromatography*, 1962, 9, 81-91.

71 FEIGL F. et GOLDSTEIN D. — *Anais. Asso. Quimp.*, Brasil, 1952, 11, 133-134, C. A. 50, 15375 a.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA STABILITE DES STEROIDES EN MILIEU LIQUIDE : LES POINTS SENSIBLES DE LA MOLECULE

Comme il a été rappelé, au sein des formes galéniques sous lesquelles ils sont présentés, les corticoïdes se trouvent au contact d'excipients les plus variés ou d'autres médicaments. Ce contact crée le risque d'une dégradation plus ou moins importante de la molécule de corticoïde au cours de la conservation. Car la molécule de corticoïde est fragile et s'altère en présence d'agents physiques ou chimiques. La dégradation de cette molécule a été très étudiée et bien que la plupart des recherches n'aient pas une orientation galénique, il est cependant nécessaire d'en connaître les conclusions, avant d'envisager l'étude de la conservation des stéroïdes dans les formes pharmaceutiques.

Les deux groupements actifs chimiquement, donc les plus sensibles aux différents agents physiques et chimiques, sont :

— Le groupement Δ 1,4,3-céto et Δ 4-3 céto-stéroïdes du noyau A.

1) *Comportement de la chaîne latérale 17, 21-diol 20-one.*

La réactivité chimique de la chaîne α -cétoïque est à l'heure actuelle bien étudiée. On a vu au chapitre des réactions analytiques que cette chaîne est douée de propriétés réductrices permettant la mise au point de très nombreuses réactions d'analyse.

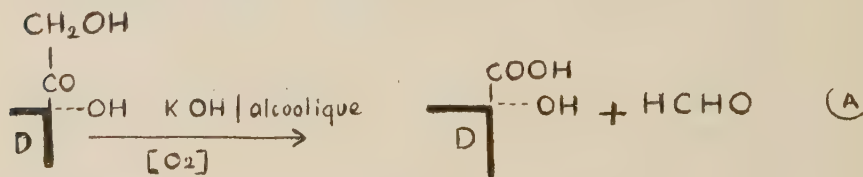
La facilité de scission ou de destruction de cette chaîne est mise à profit pour l'étude de la structure des stéroïdes ; elle constitue aussi un des plus importants processus de dégradation de la molécule au cours de la conservation.

La dégradation de la chaîne latérale 17,21-diol 20-one, commence pour les esters stéroïdes (estérification de la fonction 21-hydroxyle) par une hydrolyse plus ou moins rapide suivant le pH du milieu, généralement elle est plus rapide en milieu alcalin (113). Cette hydrolyse en milieu alcalin ou par des agents alcalins (hydroxyde de potassium, carbonate de sodium, hydroxyde de magnésium, etc...) est suivie immédiatement d'une réaction d'oxydation semblable à celle réalisée par un agent alcalin sur un corticoïde dont la fonction alcool en 21 est libre (142). Il convient donc d'admettre qu'en milieu alcalin, il y a deux réactions, la première : une hydrolyse ordinaire de l'ester et la seconde : une réaction d'oxydation se faisant uniquement sur les stéroïdes dont la fonction alcool en 21 est libre.

a) *Oxydation des stéroïdes libres en milieu alcalin.*

Les études concernant l'oxydation de la chaîne latérale en milieu alcalin liquide (aqueux ou organique) ont été effectuées avant même l'utilisation courante des corticostéroïdes ; VELLUZ et coll. (175) avaient décrit en effet cette dégradation dès 1947 et celle-ci a été ensuite confirmée par tous les chercheurs. L'hydrolyse oxydative des esters stéroïdes ou oxydation tout court des stéroïdes libres fournit des dérivés différents suivant que la réaction a lieu en présence ou en l'absence d'air (175) (80) (57).

— *En présence d'air*, la réaction prédominante est la scission de la chaîne latérale conduisant à la formation de l'acide étiénique correspondant et du formaldéhyde.



113 MARCUS A. D. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1960, 49, 383-5.

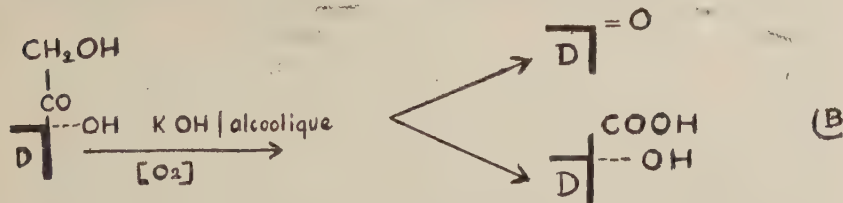
142 PESEZ M., BARTOS J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 1928.

175 VELLUZ L., PETIT A., PESEZ M. et BARRET R. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1947, fasc. 1-2.

80 GARRET E. — *J. Pharm. Sci.*, 1962, 51, 445-50.

57 DAVID E., GUTTMANN et PETERD MEISTER. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 773-8.

— En l'absence d'air, donc d'oxygène, deux réactions prédominent : on obtient alors deux dérivés stéroïdes différents : un 17-cétostéroïde et l'acide étiénique correspondant.



Selon VELLUZ, la réaction A se fait grâce à la présence de l'oxygène et ne dépend pas de la température.

Les transformations de même nature ont été rapportées par plusieurs chercheurs.

— MAISON (112) en étudiant l'oxydation de la chaîne latérale de la cortisone.

— WINDLER et GRABER (183) en utilisant le 3, 17, 21 trihydroxy-pregnane 11, 20-dione.

— CHULSKI et FORIST (172) en oxydant la chaîne latérale de la prédnisolone par de l'oxyde de magnésium en milieu aqueux.

La vitesse d'oxydation, en milieu alcalin, des stéroïdes libres ou de leur ester acétique, n'est pas notablement différente (142), car la saponification de l'ester conduit à la formation de l'acétate alcalin qui favorise l'oxydation de la chaîne cétolique libérée. Au contraire, la vitesse d'oxydation varie nettement en fonction des substituants des noyaux A, C et D (142) (109) (117) (59) (58). En procédant à l'oxydation dans un milieu liquide organique formé d'un mélange glycérol-alcool, dans lequel la consommation de l'oxygène est très ralentie, il est possible d'observer les variations des vitesses de la réaction. Ces études ont permis d'établir quelques règles.

112 MAISON H. C. — *Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic.*, 1938, 13, 235.

183 WENDLER et GRABER. — *Chem. and Indust.*, London, 1956, p. 549.

172 T. CHULSKI and FORIST. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 533.

109 LEGRAND M., DELAROFF V. et MATHIEU J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1961, p. 1346.

117 MATHIEU J., LEGRAND M. et WALLIS J. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1960, p. 549.

59 DELAROFF V., SMOLIK R., LEGRAND M. et MATHIEU J. — *Idem*, 1962, 1425-27.

58 DELAROFF V. et SMOLIK R. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 142.

1° *Substitution du noyau A.*

a) Le groupement 3-hydroxyle du noyau A favorise moins l'oxydation de la chaîne latérale que le groupement 3-cétone du noyau A.

b) L'insaturation du noyau A accélère la vitesse d'oxydation.

2° *Substitution sur le noyau C.*

Le groupement 11-hydroxyle favorise moins l'oxydation de la chaîne latérale que le groupement 11-cétone.

3° *Substitution sur le noyau D.*

L'encombrement par un groupement 16-méthyl du noyau D favorise également l'oxydation.

De même, la vitesse de saponification du groupement acétoxylyé en 21 obéit aux règles ci-dessus citées.

b) *Autoxydation catalysée par des traces de métaux.*

La dégradation de la chaîne α -cétole : 20-21 peut être également causée par des traces de métaux, tel le cuivre (116) contenu dans l'eau distillée.

c) *Oxydation par des oxydants forts.*

L'action des oxydants forts tels que acide périodique, tétracétate de plomb, acide chromique, du bismuthate de sodium, du chromate, etc... transforme également les corticostéroïdes, soit en acide étiénique, soit en 17-cétostéroïdes. La différence provient de la fonction oxygénée en 20 et de la présence ou de l'absence de l'hydroxyle en 17,

En général, si la fonction oxygénée en 20 est une cétone, l'oxydation conduit à un acide stéroïde correspondant ; si c'est une fonction alcool, elle conduit un 17-cétostéroïde correspondant.

L'action des oxydants forts est utilisée en pratique pour la détection ou pour la détermination des corticoïdes par une méthode indirecte (voir méthode de révélation chapitre IV).

d) *Modifications en milieu acide.*

En milieu liquide acide ou en présence de substances acides au sens de LEWIS tels que l'isopropoxyde d'aluminium ou le tri-

fluorure de bore, les stéroïdes présentant le groupement 17 α -hydroxy 20-cétone avec ou sans fonction hydroxyle en 21, subissent un homoréarrangement du cycle D (31) (79) (162). Cette transformation n'est possible que si l'hydroxyle en 17 est libre.

2) Comportement du noyau A.

a. — Action de la lumière ultra-violette.

La présence de la double liaison en α - β du groupement oxo du noyau A, confère aux stéroïdes la propriété d'absorber les rayons ultra-violets de longueur d'onde comprise entre 230-270 m μ . Cette propriété est mise à profit pour leur détection et leur détermination. Mais cette absorption des rayons ultra-violets est également une des causes de la dégradation de la molécule. Les stéroïdes soumis plus ou moins longtemps à l'action du rayonnement ultra-violet, subissent une transformation très complexe, portant soit sur le seul noyau A, soit simultanément sur les noyaux A et B.

SAVARD et coll. (151), par irradiation de Δ -4-3-cétostéroïdes en solution alcoolique, constatent par chromatographie sur papier, l'apparition de 3 spots au lieu d'un. Selon ces auteurs la transformation se fait, soit par une saturation du noyau A, soit par une migration de la double liaison, soit par les deux modifications en même temps.

A partir d'un Δ -1,4-3-cétostéroïdes, en l'occurrence l'acétate de prédnisone, BARTON et TAYLOR (19) montrent que :

— L'irradiation en milieu aqueux acide acétique provoque un remaniement des noyaux A et B, respectivement en cycle à 5 et 7 carbones.

— L'irradiation en milieu éthanolique transforme l'acétate de prédnisone en lumiprédnisone qui serait très rapidement hydrogénée en dihydrolumiprédnisone.

Selon ces mêmes auteurs, cette transformation serait une réaction générale du système comprenant le groupement 11-cétone et le groupement diénone du noyau A : l'androsta-1,4-diène-3,11,

31 BOWERS A., DENOF E., BLANCA M., SANCHEZ et RINGOLD N.J. — *Tetrahedron*, 1959, 7, 153.

79 FUKUSHIMA D.K., S. DOBRINER, M.S. HEFFER, T.H. KRITCHVESKY. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6585.

162 STANEY H.E. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, 63, 3127.

151 SAVARD K. et Coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 6327.

19 BARTON and TAYLOR. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 244.

17-trione soumis aux mêmes conditions expérimentales subit une transformation analogue (18).

L'irradiation par des rayons ultra-violetes peut également provoquer un réarrangement diénone-phénol du noyau A, réaction qui a été décrite pour la première fois en 1911 par STAUDINGER et BEREZA (163). DUTLER et coll. (64) (65) obtiennent une conversion semblable en irradiant la 11-déhydrotestostérone en solution dans le dioxanne.

BARTON et TAYLOR, en suivant les conditions expérimentales fixées par DUTLER et coll., montrent que la conversion diénone-phénol des stéroïdes conduit à la forme para-phénolique.

Quant à la vitesse de transformation provoquée par cette irradiation, elle est beaucoup plus rapide chez les Δ -1,4,3 cétostéroïdes que chez les Δ -4,3cétostéroïdes. Cette différence est déjà manifeste lorsqu'on expose les chromatogrammes à la lumière ultra-violette de longueur d'onde 255 m μ , le spot représentant les stéroïdes de la série Δ -1,4, subit, après environ 30 secondes d'exposition, un virage du violet sombre à une fluorescence bleu-clair, alors que le spot représentant des stéroïdes du type hydrocortisone, conserve la même fluorescence bleu sombre.

HAMLIN, T. CHULSKI, R. H. JOHNSON et WAGNER (89) soumettent l'hydrocortisone, la prédnisone et la méthyl-prédnisone à une irradiation ultra-violette de 6 heures ; ils évaluent les stéroïdes initiaux par spectrophotométrie ultra-violette et la réaction à l'isoniazide, deux réactions spécifiques du noyau A. Les résultats obtenus sont très éloquents, les auteurs retrouvent 86 % de l'hydrocortisone, mais seulement 27 % de prédnisone. Les courbes représentant la conversion ou plus exactement la disparition de la prédnisone et de la méthyl-prédnisone sont presque superposables ; alors que celle représentant la disparition de l'hydrocortisone a une pente de 5 à 6 fois moins inclinée que les deux précédentes.

-
- 18 BARTON and THAFIG. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 928.
163 STAUDINGER et BEREZA. — *Annalen*, 1911, 380, 243.
64 DUTLER, BOSSHAND et JEGER. — *Helv. Chim. Acta*, 1957, 46, 494.
65 DUTLER, C. GANTER, M. REFF et Coll. — *Helv. Chim. Acta*, 1962, 45, 2346.
89 HAMLIN W. E., T. CHULSKI, R. H. JOHNSON et WAGNER. — *J. A. P. A.*, 1960, 49, 2535.

b. — *Autoxydation en milieu alcalin.*

On a vu plus haut qu'en milieu alcalin, il se produit une dégradation par oxydation de la chaîne latérale. Dans les mêmes conditions, le groupement formé par la double liaison en α - β du groupement oxo du noyau A peut subir aussi une transformation par auto-oxydation. Cette réaction auto-oxydative n'a lieu qu'en présence de l'air ; elle se traduit par l'incorporation d'un atome d'oxygène soit sur le noyau A, soit sur le noyau B. CAMERINO et coll. (34) réalisent, en milieu alcalin, l'auto-oxydation d'une série de stéroïdes dérivés de l'androstane et du prégénane. Ils montrent que la réaction se fait aussi bien avec les stéroïdes saturés qu'avec les stéroïdes insaturés.

c) Parmi les agents chimiques oxydants du système insaturé du noyau A, l'ozone est certainement le plus brutal, détruisant tout le système Δ -1,4-3 cétone du noyau A (43).



Il ressort de cette revue deux notions importantes :

— L'extrême sensibilité des corticostéroïdes aux agents physiques et chimiques et leur grande fragilité.

— Les groupements sensibles de la molécule sont la chaîne latérale 17 α , 21-diol 20-one et la séquence insaturée du noyau A.

— Mais les conditions expérimentales évoquées ci-dessus font appel à des facteurs physico-chimiques variés qui constituent des agents traumatisants violents pour la molécule stéroïde.

— Toutes les réactions rapportées ont lieu en milieu liquide aqueux ou organique, c'est-à-dire dans les conditions assez éloignées de celles que vont rencontrer les stéroïdes au cours de notre étude de leur conservation dans les formes pharmaceutiques.

43 CASPI E., SCHMID W. et B. Taqui KHAN. — *Tetrahedron*, 1962, 18, 767-775.

CHAPITRE VI

PROTOCOLE DE CONTROLE DES COMPRIMES A BASE DE CORTICOIDES

La littérature n'est pas très prodigue de publications concernant les modalités de contrôle des comprimés de corticoïdes. Si plusieurs pharmacopées s'intéressent au contrôle des corticoïdes en tant que substances pures, seules les pharmacopées de langue anglaise : B. P. 1963, l'U. S. P. XVI et la Pharmacopée internationale consacrent des monographies aux comprimés à base de corticoïdes.

Il nous a paru intéressant de confronter les données de diverses pharmacopées : française (Pro pharmacopoea), internationale, l'U. S. P. XVI, B. P. 1963, Pharmacopée helvétique, Pharmacopée belge et le Formulaire pharmaceutique des Services de Santé des Armées.

Le nombre des corticoïdes inscrits est très inégal d'une Pharmacopée à l'autre. Les Pharmacopées belge et helvétique n'ont retenu que l'acétate de désoxycorticostérone ; 7 corticoïdes sont inscrits à Pro pharmacopoea, et 5 au Formulaire pharmaceutique des Services de Santé des Armées. Les Pharmacopées anglaise, américaine et internationale mentionnent un plus grand nombre de monographies, soit de corps purs, soit de formes médicamenteuses.

Tout contrôle analytique doit être toujours précédé d'une extraction de principe actif. Le choix de la méthode est conditionné par plusieurs facteurs, dont les plus importants sont :

— La nature du corticoïde, essentiellement de sa polarité ; la triamcinolone par exemple qui est un stéroïde plus polaire

que l'hydrocortisone, ne peut être extraite quantitativement d'un milieu aqueux par des solvants organiques chlorés, mais exige l'emploi de l'acétate d'éthyle.

— La nature de la forme galénique : le problème est différent pour une pommade, un soluté et pour un comprimé par exemple, selon la nature des charges ou adjuvants.

— Le protocole d'extraction doit également tenir compte du but recherché. Pour un contrôle qualitatif, l'opération doit fournir un extrait très pur, ce qui nécessite le choix d'un solvant bien approprié et une manipulation délicate et répétée. Dans le cas d'un dosage, au contraire, les opérations doivent être réduites au minimum pour éviter le plus possible les risques de perte, mais dans ce cas, la pureté de l'extrait et la précision du dosage en souffrent.

— Les solvants les plus utilisés sont : l'acétate d'éthyle, le benzène, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le trichloréthylène, le dichloroéthane, le dichloro-méthane, et surtout l'éther, le chloroforme et l'alcool éthylique. L'éther de pétrole est un mauvais solvant des corticoïdes, il peut être utilisé pour délipider les extraits en solution aqueuse ou hydro-alcoolique à 70 %.

— Les solvants chlorés et le benzène sont utilisés pour l'extraction des corticoïdes neutres peu polaires. Le chloroforme et les solvants dichlorés purs ou combinés à l'éther éthylique sont d'excellents solvants de corticoïdes polaires.

Procédés d'extraction des corticoïdes des comprimés.

Il ne sera envisagé ici que les procédés d'extraction des corticoïdes des comprimés, le choix du solvant doit tenir compte :

- de la solubilité du corticoïde ;
- de la nature des excipients ;
- du but du contrôle : qualitatif ou quantitatif.

En principe, les corticoïdes anti-inflammatoires sont insolubles dans l'eau. Cependant. GUTTMANN et coll. (86) ont essayé, paraît-il, avec succès, de les dissoudre dans une solution aqueuse de TRITON W. R. 1339.

86 GUTTMANN D.E. et Coll. — *J. Pharm. Sci.*, 1961, 50, 305-308.

WAGNER et coll. (181) (12) ont fait une étude comparative des différentes méthodes de détermination de la prédnisolone dans les comprimés. Dans la première méthode le stéroïde est extrait par le chloroforme d'une suspension aqueuse de comprimé, puis séparé des composants non stéroïdiques, par chromatographie sur papier, et dosé après élution du spot par spectrophotométrie. Dans une deuxième méthode, le stéroïde est extrait par le chloroforme qui est ensuite évaporé, le résidu est repris par l'alcool éthylique, et le dosage est fait avec le réactif au chlorure de triphényltétrazolium. Dans la troisième méthode, le stéroïde est extrait par l'alcool et dosé par le chlorure de tétrazolium. Si les deux premières méthodes donnent des résultats similaires, la troisième n'a pas donné satisfaction aux auteurs. La solubilité dans l'alcool absolu du lactose utilisé comme excipient est suffisante pour interférer de façon importante dans la détermination du stéroïde avec le sel de tétrazolium.

Protocoles retenus par les Pharmacopées.

Les solvants les plus utilisés sont : l'alcool éthylique absolu et le chloroforme, à l'exception de la DOCA qui est extraite par l'acétone (U. S. P. XVI).

L'alcool est utilisé tiède (49), ou à froid (156) (171) (Pharmacopées anglaise, américaine et internationale).

Le chloroforme est le plus souvent utilisé comme solvant intermédiaire ; quand l'extraction est terminée, on fait évaporer le chloroforme, le résidu est ensuite repris par l'alcool absolu (3) (44) (181) (U. S. P. XVI) (British Pharmacopoea).

La Pharmacopée anglaise emploie le chloroforme pour l'extraction de prédnisone, prédnisolone, méthylprédnisolone, fludrocortisone, dexaméthasone et cortisone des comprimés. Les comprimés sont pesés et pulvérisés, on prend une quantité de poudre correspondant à 15 mg de stéroïde, qu'on met en suspension dans 10 ml d'eau. On fait l'extraction en 4 fois avec (100, 50, 50 et 40 ml) de chloroforme. Les extraits chloroformiques réunis sont complétés à 250 ml. On prend une partie adéquate correspondant à une teneur définie de corticostéroïde, on l'évapore. Le résidu

181 WAGNER J. G., DALE J. K., SCHLAGEL L. A., MEISTER P. D., BOOTH R. E. — *J. A. P. A. (Sc. Ed.)*, 1958, 47, 580-4.

49 CINGOLANI E. — *Il Farmaco* (Ed. Sci.), 1956, 11, 726-736.

156 SMITH L. L., HALWER M. — *J. A. P. A.*, 1959, 48, 348-352.

171 T. CHULSKI, ARLINGTON, A. FORIST. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 553-555.

3 ANSARI S., KHAN R. A. — *J. Pharm. and Pharmacol.*, 1960, 12, 122-125.

44 CAVINA G., CINGOLANI E. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, 246-258.

est prêt à servir à l'identification, ou bien est repris par l'alcool absolu en vue du dosage.

Les pharmacopées américaine et internationale préconisent deux modalités d'extraction différentes, suivant que l'extrait est destiné à l'identification ou au dosage.

L'extraction destinée à une réaction d'identification.

Les comprimés sont pulvérisés, on prend une quantité de poudre correspondant à 50 mg de stéroïde qu'on fait digérer avec 15 ml d'éther de pétrole pur ou d'hexane pendant 15 minutes. On décante aussi complètement que possible et on fait digérer à nouveau successivement avec 10 ml d'éther de pétrole pur et 10 ml d'éther pur exempt de peroxyde. On rejette les solvants après décantation. On ajoute au résidu 25 ml d'éthanol absolu. On fait digérer en agitant pendant 15 minutes. On décante sur un filtre, puis on évapore à siccité au bain-marie. Le résidu d'évaporation peut être utilisé pour faire des réactions d'identification.

L'extraction en vue du dosage.

On pèse 10 comprimés et on les pulvérise. On prend une quantité de poudre exactement pesée correspondant à 25 mg de stéroïde, on l'entraîne dans une fiole de 100 ml, à l'aide de 75 ml d'alcool éthylique absolu. On laisse en contact une heure en agitant fréquemment ; on complète avec l'alcool absolu à 100 ml, on mélange et on filtre. L'extrait obtenu est prêt pour les réactions de dosage.

Dans le cas où l'extraction directe par l'alcool donne un extrait qui ne permet pas la mise en œuvre des réactions de dosage : expérience de WAGNER et coll. mentionnée ci-dessus, on utilisera le chloroforme comme premier solvant extractif. La poudre exactement pesée est entraînée dans une fiole à décantation à l'aide de 15 ml d'eau distillée ; on agite pendant 15 minutes. On fait ensuite l'extraction en 4 fois avec le chloroforme. La solution chloroformique réunie et complétée à un volume voulu est filtrée puis évaporée à sec. Le résidu est enfin repris par l'alcool éthylique absolu.

Protocoles de contrôle des Pharmacopées (voir tableau ci-contre).

Seules sont envisagées ici les monographies consacrées aux corps purs et aux corticoïdes des comprimés, après extraction par des techniques vues précédemment. Ces monographies comprennent une description des caractères physico-chimiques, la détermination du taux de cendres et d'humidité, les réactions d'identification et plus rarement le dosage et la recherche des stéroïdes étrangers voisins.

Parmi les caractères physico-chimiques, on note la solubilité dans différents solvants, le pouvoir rotatoire dans l'alcool éthylique, dans le dioxanne ou encore dans l'acétone, le point de fusion de la substance pure ou de son dérivé avec la 2,4 dinitro-phénylhydrazine. L'absorption ultra-violette à courte longueur d'onde comprise entre 238-242 m μ d'une solution méthanolique ou éthylique est utilisée par toutes les pharmacopées avec éva-

1 p. 100

luations E ———— comme critère d'identité. Le spectre infra-
1 cm

rouge est utilisé par les pharmacopées américaine et anglaise.

Les réactions chimiques comprennent les réactions d'halochromie : réaction à l'acide sulfurique et à l'acide phosphorique.

La réaction de BUSH est retenue par la seule Pharmacopée anglaise (acétate de cortisone et prédnisone). La réaction à la 2-4-dinitrophényl-hydrazine est utilisée par la Pharmacopée internationale, le Pro Pharmacopoea et le Formulaire Pharmaceutique des Services de Santé des Armées. Ces trois pharmacopées retiennent également la réaction de PORTER et SILBER.

La propriété réductrice du groupement α -cétoïque est mise en évidence vis-à-vis d'un grand nombre de réactifs, qui sont : le nitrate d'argent ammoniacal, le périodate argentique, le cupri-tartrate de potassium, le mercuri-iodure de potassium.

Les éléments minéraux : fluor, sélénium, sodium, sont mis en évidence par des réactions spécifiques, ces éléments sont recherchés comme constituants du stéroïde ou comme impuretés des produits de synthèse. Quant aux impuretés stéroïdiques, seules les Pharmacopées américaine et anglaise ont exigé leur recherche ; celle-ci est réalisée par la chromatographie sur papier.

DOCA	PF α D I. R. U. V.	— — I. R. U. V. : dosage cupri-tartrate K SO_4H_2	PF α D — U. V. — NO ₃ Ag Amm. U. V.	— — — — — SO ₄ H ₂	PF α D — — — — SH ₂ H ₂ + EOH	NO ₃ Ag Amm. PO ₄ H ₃ CH ₃ - COO -	PF α D U. V.
Cortisone Acétate	PF α D I. R. U. V. H ₂ SO ₄ TPTZ : dosage chromatog CH ₃ - COO -	PF α D I. R. U. V. : dosage cupri-tartrate K réaction de Bush H ₂ SO ₄ TPTZ : dosage chromatog	PF α D U. V. — — H ₂ SO ₄ TPTZ	U. V. mercuri-iodure K H ₂ SO ₄	PF α D U. V. mercuri-iodure K H ₂ SO ₄	U. V. : dosage — H ₂ SO ₄ Cl de PTZ chromatog CH ₃ - COO -	U. V. : dosage — H ₂ SO ₄ Cl de PTZ chromatog CH ₃ - COO -
Hydrocortisone et Acétate	PF α D I. R. U. V. TPTZ : dosage chromatog CH ₃ - COO -	PF α D I. R. U. V. : dosage cupri-tartrate K TPTZ : dosage chromatog	PF α D U. V. — — H ₂ SO ₄ Phénylhydrazine	U. V. H ₂ SO ₄ Phénylhydrazine	PF α D U. V. mercuri-iodure K périodate argent, Phénylhydrazine H ₂ N - OH	U. V. : dosage Cl de PTZ chromatog CH ₃ - COO -	
et Acétate Prédnisone	PF α D I. R. U. V. TPTZ : dosage chromatog	PF α D I. R. U. V. : dosage Recherche du F Cupri-tartrate K TPTZ : dosage chromatog	PF α D — — — — — —			U. V. : dosage H ₂ SO ₄ Recherche du F thiosemicarbazone chromatog	
et Acétate Prédnisone	PF α D I. R. U. V. TPTZ : dosage chromatog	PF α D I. R. U. V. : dosage cupri-tartrate K fluor TPTZ : dosage chromatog				α D (34')	

Réactions intéressant le dosage.

Seules les Pharmacopées anglo-saxonnes et le Pro Pharmacopoea mentionnent des recherches quantitatives.

Le Pro Pharmacopoea dose les corticoïdes par l'absorption ultra-violette, la mesure de la densité optique se fait dans une solution méthanolique ; la triamcinolone est dosée par son taux en fluor.

L'U. S. P. XVI dose les corticoïdes par la réaction au chlorure de triphényl tétrazolum.

La Pharmacopée anglaise 1963 retient deux critères :

— absorption ultra-violette ;

— réaction au chlorure de triphényltétrazolum.

Etant donné le grand nombre de comprimés de corticoïdes spécialisés existant en France et dans le monde, il serait surprenant que la Pharmacopée française en voie de préparation ne comporte pas de monographies concernant les principaux corticostéroïdes et leurs formes d'administration. A l'exemple de la Pharmacopée anglaise, ces monographies devraient réunir des essais d'identification, de pureté (chromatographie sur papier), et un dosage effectué par au moins une réaction spécifique de chacun des deux groupements caractéristiques.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE VII

BASES ET CONDITIONS DE NOS RECHERCHES

La cortico-thérapie est devenue en une décade une des branches majeures de la thérapeutique moderne. Le premier pays producteur et utilisateur des corticoïdes est sans aucun doute les U. S. A. La France, malgré son retard, non pas du point de vue des études théoriques où elle est un des premiers pays, sinon le premier qui a contribué à l'épanouissement de la cortico-thérapie, mais du point de vue de la production de ces hormones, a vu la production nationale atteindre le chiffre de 10 tonnes dès 1960 pour les seuls corticoïdes anti-inflammatoires, c'est dire que ces hormones sont importantes non seulement comme facteur thérapeutique, mais également comme facteur économique du pays, étant donné leur prix relativement élevé (*).

Parallèlement à l'augmentation de la production et à l'extension du champ d'application en médecine, les formes pharmaceutiques spécialisées de corticoïdes se multiplient très rapidement. Mais de toutes les formes pharmaceutiques à base de corticoïdes, la forme comprimé est de loin la plus importante tant du point de vue de l'utilisation que du point de vue de la quantité de corticoïdes entrant dans sa fabrication.

Les corticoïdes les plus utilisés pour la fabrication des comprimés sont des corticoïdes libres et leurs esters acétiques qui ne sont pas hydrosolubles. Récemment, on a vu apparaître des comprimés à base de corticoïdes solubles qui sont des esters hémisucciniques, diphosphoriques et métasulfobenzoïques à l'état des sels de sodium.

(*) Le prix commercial d'un gramme est le suivant :

Hydrocortisone : 11 F.
Prédnisone : 32 F.

1° But poursuivi.

Bien que les comprimés à base de corticoïdes soient largement répandus en tant que médicaments, on ne rencontre que très peu de travaux dans la littérature pourtant abondante consacrée aux corticoïdes, sur l'étude de la conservation de ces derniers dans les formes pharmaceutiques et en particulier sur leur contrôle dans les comprimés. Pourtant, la mise en œuvre d'une technique de contrôle des corticoïdes dans les formes pharmaceutiques rencontre beaucoup de difficultés dès le stade de l'extraction. Le choix d'une méthode d'extraction ainsi que celui du solvant à employer doivent tenir compte de plusieurs facteurs dont les principaux sont :

- le but de l'analyse ;
- la nature du stéroïde, essentiellement de sa polarité ;
- la forme galénique ;
- le ou les excipients ou adjuvants de fabrication et le, ou les médicaments associés s'il y a lieu ;
- le pouvoir d'extraction sélectif du solvant ; en effet, les corticoïdes sont constamment contaminés par des molécules stéroïdes ou non stéroïdes voisines, et dans les formes pharmaceutiques par des molécules résultant de la dégradation de la molécule principale.

Une fois établie la méthode d'extraction, il faut rationnellement choisir les réactions de caractérisation et de dosage. Si le grand nombre des réactions analytiques est le signe de l'importance de ces substances, il traduit également le peu de mania-bilité et le manque de spécificité de ces réactions ; chacune d'elles peut être utilisée pour détecter ou déterminer plusieurs stéroïdes à cause de la présence de groupements chimiques communs ; or, les stéroïdes ont toujours un ou plusieurs groupements communs.

La confusion risque d'être encore plus grande lorsqu'il s'agit des corticoïdes se trouvant dans les formes galéniques ; sous l'action de certains agents physiques et au contact avec des substances chimiques étrangères, l'un des deux groupements actifs de la molécule peut être dégradé, alors que l'autre n'est pas touché. Ceci peut entraîner une atténuation, voire la disparition

de la positivité vis-à-vis de certaines réactions, tandis qu'avec d'autres, la positivité est maintenue dans toute sa totalité ; si le contrôle est effectué par des réactions spécifiques du groupement non touché, la dégradation ne sera pas décelée. Prenons un exemple concret : en milieu alcalin et en présence de l'oxygène, les Δ -4-3 céto-17 α , 21-dihydroxy-20 cétostéroïdes se transforment en partie en acides stéroïdes correspondants par destruction de la chaîne latérale, α cétolique en 20-21. Ces deux corticoïdes ont en commun le groupement Δ -4-3 cétone du noyau A qui réagit au point de vue chimique exactement de la même façon dans l'un et l'autre cas avec les réactifs qui lui sont spécifiques. Ainsi, la mesure de la densité optique de l'absorption ultra-violette ou de la réaction à l'I. N. H. ne permet pas de déceler la transformation. D'autre part, certains produits de dégradation peuvent conserver les deux groupements actifs généralement utilisés en analyse, tels les lumidérivés (20) et les 4-hydroxystéroïdes, produits de transformation des stéroïdes par auto-oxydation (34). Les réactions de dosage, dans ce cas, évalueront en même temps les stéroïdes dérivés et les stéroïdes initiaux.

Il en résulte qu'il est nécessaire pour le contrôle des corticoïdes dans les formes pharmaceutiques, d'utiliser au moins une réaction spécifique pour chacune des deux séquences suivantes : 17 α , 21-dihydroxy-20-cétone et Δ -4-3-cétone du noyau A. Les résultats obtenus doivent être en outre, complétés par une analyse qualitative comportant obligatoirement une séparation chromatographique sur papier ou en couches minces. En effet, jusqu'à preuve du contraire, la chromatographie sur papier ou en couches minces est la seule technique qui permette la séparation des stéroïdes les plus voisins. On a aussi préconisé l'analyse qualitative des corticoïdes par l'étude cristallographique aux rayons X des différentes formes micro-cristallines des stéroïdes ; mais cette technique n'est pas à la portée de tous les laboratoires et elle n'est pas une technique de séparation.

Les causes de dégradation et de transformation des corticostéroïdes sous l'influence de divers agents physicochimiques ont été étudiées en détail au chapitre V. Rappelons simplement que parmi les facteurs physiques, les rayons ultra-violets ou la

20 BARTON D. H. R. et TAYLOR W. C. — *J. Chem. Soc.*, 1958, 2500.

34 CAMERINO BRUNO, PATELLI Bianca. — *Gazzetta Chimica II*, 92, p. 676.

lumière ont une action particulièrement redoutable, en ce sens qu'ils peuvent transformer les stéroïdes en lumidérivés qui gardent intacts les deux groupements actifs de la molécule, masquant ainsi l'altération à toutes les réactions. Parmi les substances chimiques, la première place revient à l'oxygène, qui transforme la chaîne latérale des 17 α , 21 - dihydroxy 20 - cétostéroïdes en 17 - cétostéroïdes ou acides stéroïdes correspondants, mais qui peut aussi s'introduire soit dans le noyau A, soit dans le noyau B, sans modifier les autres groupements ; et le problème à résoudre est alors identique à celui posé par les lumidérivés.

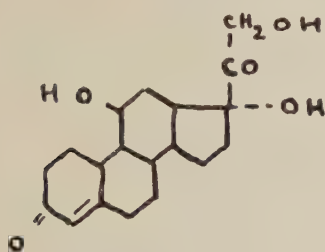
L'action dégradante des autres substances chimiques a l'avantage, si l'on peut dire, de transformer les corticostéroïdes en molécules n'ayant plus tout à fait la même réactivité que les molécules initiales : dans ce cas, il est possible de mettre en évidence la dégradation seulement par l'analyse quantitative. Ainsi, les substances alcalines et certains agents oxydants provoquent une altération plus ou moins importante de la chaîne 17 α , 21 - diol - 20 - one, tout en laissant le noyau A tel quel ; inversement, l'action de certains autres tel l'ozone peut dégrader le noyau A sans toucher la chaîne latérale, si celle-ci est protégée par estérification. Dans l'un et l'autre cas, on peut, grâce à l'utilisation de réactions bien choisies, révéler les transformations.

Mais toutes ces données découlent d'études purement chimiques, la grande majorité des travaux, pour ne pas dire tous, ne font pas état du comportement des stéroïdes dans les formes galéniques. De plus, les différentes recherches sont faites avec des stéroïdes étalon et en milieu liquide aqueux ou organique ; les réactions se déroulent pendant un temps très court de l'ordre de quelques minutes et tout au plus en 1 ou 2 heures. A notre connaissance, il n'existe pas d'études faites en milieu solide et encore moins dans les formes pharmaceutiques solides.

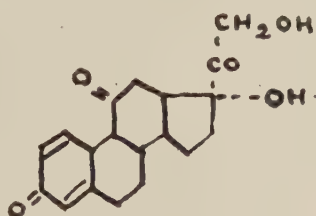
Ceci nous a incité, étant donné la vogue actuelle des comprimés à base de corticostéroïdes, à rechercher l'influence de quelques facteurs physiques et chimiques sur la conservation de ces derniers dans les différents milieux solides constituant des poudres à comprimer..

2° Stéroïdes retenus dans ce travail.

Les stéroïdes utilisés pour cette étude sont : l'hydrocortisone et la prédnisone :



Hydrocortisone



Prédnisone

Les deux hormones ont été choisies en raison de leur place prédominante en corticothérapie anti-inflammatoire d'une part, et de leur structure chimique d'autre part. L'hydrocortisone et la prédnisone sont en effet les mieux connues du point de vue activité physiologique et thérapeutique et sont par conséquent les plus utilisées.

L'hydrocortisone est l'hormone naturelle sécrétée par la glande surrénale, elle constitue avec son dérivé d'oxydation également physiologique, la cortisone, le traitement substitutif des insuffisances surrénaliennes, mais n'en occupe pas moins une place importante en thérapeutique anti-inflammatoire.

La prédnisone, dérivé de synthèse, possède par rapport à son homologue naturel la cortisone une double liaison supplémentaire entre les carbones 1 et 2. Or, si cette modification de structure apparaît au premier abord insignifiante, elle est responsable d'une certaine transformation de propriétés biochimiques et physiologiques de l'hormone naturelle et surtout d'une augmentation importante de propriétés anti-inflammatoires.

Au point de vue analytique et galénique, cette insaturation en 1-2 s'accompagne de changements dans les réactions analytiques, dans le comportement chromatographique et également dans la sensibilisation de la molécule aux agents physico-chimiques. Ainsi, la prédnisone ne donne pas, contrairement à l'hydrocortisone, la fluorescence verte en milieu sulfurique concentré et réagit plus lentement et plus difficilement avec l'I.N.H. L'action des rayons ultra-violets de longueur d'onde

d'environ 260 m μ sur la prédnisone est immédiate et se traduit par un changement de fluorescence (bleu-sombre en bleu clair), qu'on peut visualiser sur les chromatogrammes, alors qu'avec l'hydrocortisone, on ne constate pas une telle modification de fluorescence pendant le même temps d'exposition (*); quantitativement, cette différence est également démontrée (89); la double liaison en 1-2 accélère également la vitesse de saponification des esters de stéroïdes (59); ainsi que la vitesse d'oxydation de la chaîne latérale 17 α , 21-diol-20-one (142).

Un deuxième point différent dans la molécule de nos deux stéroïdes concerne la fonction oxygénée en 11 qui est une fonction alcool secondaire dans le cas de l'hydrocortisone et une fonction cétone dans le cas de la prédnisone; mais cette différence dans la nature de l'oxygène porté par le carbone 11, n'a aucune influence sur le comportement chimique de la molécule, puisqu'on sait que l'oxygène en 11, quelle que soit sa nature, est très peu réactif.

3° Composition des milieux étudiés.

Les études de la conservation sont faites dans les milieux solides suivants :

Formule 1

— stéroïde	10 g
— amidon de blé	160 g
— magnésie calcinée	40 g
— sulfate de calcium	60 g
— lactose	126 g
— stéarate de magnésium ..	4 g

Formule 2

— stéroïde	10 g
— amidon de blé	150 g
— lactose	120 g
— saccharose	150 g
— stéarate de magnésium	2 g

(*) L'U. S. P. XV utilise cette propriété pour différencier les Δ -1,4,3 cétostéroïdes des Δ -4,3 cétostéroïdes.

Formule 3

— stéroïde	10 g
— acide citrique cristallisé ...	196 g
— amidon de blé	190 g
— acide stéarique	4 g

Formule 4

— stéroïde	10 g
— amidon de blé	148 g
— phosphate bicalcique	176 g
— lévillite	2 g
— dextrine	42 g
— stéarate de magnésium	4 g

Formule 5

— stéroïde	10 g
— fécule de pomme de terre ..	150 g
— talc	40 g
— lévillite	32 g
— phosphate bicalcique	84 g
— stéarate de magnésium	4 g

Ces formules ont été élaborées dans la perspective de l'obtention de poudres destinées à être transformées en comprimés pour l'usage interne.

Le choix des composants repose sur les propriétés suivantes :

— Les amidons, la dextrine et la fécule de pomme de terre, substances inertes, sont à la fois *diluants* et *lubrifiants*.

— Le saccharose et le lactose sont à la fois *diluants* et *liants*.

— Le sulfate de calcium et la lévillite sont *diluants* et *absorbants*.

— L'acide stéarique et le stéarate de magnésium sont des *lubrifiants*.

— Le phosphate bicalcique est à la fois *diluant* et substance *tampon*.

— L'acide citrique est un *diluant* qui assure au mélange une *réaction acide*.

— La magnésie calcinée est un *diluant* qui assure au mélange une *réaction alcaline*.

On constate la présence de substances chimiques qui peuvent conférer au milieu une réaction acide ou basique. Or, on a vu au chapitre V que la stabilité de la molécule en solution est liée à la valeur du pH du milieu. Sur chacun de nos milieux d'étude, nous avons contrôlé le pH du soluté obtenu par mise en suspension aqueuse de la poudre du milieu de la façon suivante : on prend 120 mg du mélange, qu'on met en suspension dans 4 ml d'eau distillée, on agite pendant 15 minutes, on filtre et on mesure le pH de chaque soluté obtenu au pH-mètre.

— Le mélange numéro 1, qui contient magnésie calcinée et sulfate de calcium, donne un soluté aqueux à réaction alcaline pH 10,2.

— Le mélange numéro 2, dont la masse diluante est constituée par l'amidon, le saccharose et le lactose, donne une solution aqueuse à réaction légèrement alcaline de pH 8,1.

— Le mélange numéro 3, dont la moitié de la masse diluante est constituée par l'acide citrique, donne une solution aqueuse à réaction franchement acide pH 2,2.

— Le mélange numéro 4, qui contient le phosphate bicalcique, donne une solution aqueuse à pH 6,4.

— Le mélange numéro 5, qui contient du phosphate bicalcique et du talc, donne une solution aqueuse à pH 8,1.

Nous avons donc un mélange à réaction alcaline (n° 1), un mélange à réaction acide (n° 3) et deux mélanges, le mélange n° 2 qui ne contient pas de poudre minérale et le mélange n° 5, qui contient des poudres minérales qui ont une réaction légèrement alcaline, et un mélange à réaction légèrement acide (n° 4).

Les produits terminaux renfermant le corticostéroïde sont désignés comme suit :

— Les mélanges dont l'hydrocortisone est le principe actif : mélanges I, II, III, IV, V, correspondant respectivement aux formules n°s 1, 2, 3, 4 et 5.

— Et les mélanges ayant la prédnisone comme principe actif : mélanges I bis, II bis, III bis, IV bis et V bis.

4° Conditions de l'étude expérimentale.

L'étude expérimentale est conduite de la façon suivante :

a) Conditions de la conservation.

Chaque mélange est divisé en trois parties égales, et chaque partie est placée dans un petit flacon en verre bouché.

— Un flacon est conservé à la température du laboratoire.

— Un autre flacon est conservé à l'étuve à 37° C.

— Un troisième est conservé à l'étuve à 50° C.

Ceci permet d'étudier le comportement de l'hydrocortisone et de la prédnisone en fonction du mélange, c'est-à-dire vis-à-vis des différentes substances chimiques, en fonction de la température et naturellement en fonction du temps.

b) Modalités de contrôle.

Le contrôle des corticostéroïdes de nos mélanges est réalisé successivement comme suit :

- 1) Chaque mois, nous avons mis en œuvre l'extraction du principe actif sur tous nos mélanges conservés à différentes températures et effectué un double contrôle, quantitatif et qualitatif.
- 2) Le contrôle quantitatif, réalisé à partir des extraits alcooliques est fait en recourant aux trois réactions suivantes :

a) La mesure de la densité optique de l'absorption ultraviolette à 241 m μ .

b) La réaction à l'hydrazide de l'acide isonicotinique.

Ces deux réactions servent à apprécier l'intégrité du noyau A.

c) La réaction de Porter et Silber permet le dosage du groupement 17 α , 21 - dihydroxy - 20 - cétostéroïdes de la chaîne latérale.

- 3° Le contrôle qualitatif permet d'affirmer à la fois l'authenticité des résultats du dosage et d'identifier les stéroïdes dérivés par dégradation de l'hydrocortisone et de la prédnisone.

CHAPITRE VIII

METHODES D'EXTRACTION

Nous avons adopté les techniques préconisées par l'U. S. P. XVI, dont le protocole opératoire comporte, pour le dosage de l'hydrocortisone dans les comprimés, l'emploi comme solvant soit de l'alcool éthylique absolu, soit du chloroforme.

1° Etude comparée des deux procédés d'extraction.

A. — *Principe.*

Dans le cas où l'alcool absolu est utilisé comme solvant, l'extraction est directe, ce qui suppose que l'action dissolvante de l'alcool est sélective pour les seuls cortico-stéroïdes, à l'exclusion de tout autre composant du milieu.

L'extraction par le chloroforme est effectuée à partir d'un milieu aqueux, il y a donc 2 solvants en présence, l'extraction dépend du coefficient de solubilité des produits dans les solvants. Les corticoïdes sont plus solubles dans le chloroforme que dans l'eau, ils seront extraits par ce solvant organique en plusieurs fois, à l'exclusion de toutes substances plus solubles.

La première méthode a l'avantage d'être une méthode directe, n'employant qu'un seul solvant, de manipulation simple, donc le risque de perte du principe actif en cours d'opération est réduit au minimum.

En contre-partie, l'alcool peut solubiliser une quantité non négligeable de certains excipients tels l'acide citrique, le lactose, le saccharose, etc... ce qui peut être une gêne pour les réactions analytiques.

La méthode utilisant le chloroforme comme solvant n'a pas cet inconvénient, elle est plus spécifique ; mais le risque d'une certaine perte du principe actif au cours de la manipulation est plus grand.

B. — *Pratique.*

Il nous a paru intéressant de réaliser une étude expérimentale comparée de ces deux méthodes en prenant pour objet l'extraction de l'hydro-cortisone de comprimés commercialisés.

Les produits extraits sont dosés en utilisant les réactions (*) :

- 1° Réaction de Porter et Silber ;
- 2° Spectre d'absorption en milieu méthanolique ;
- 3° Réaction à l'I. N. H.

Parallèlement, nous avons soumis, pour un contrôle qualitatif, les mêmes extraits à la méthode chromatographique, en utilisant les systèmes chloroforme-formamide-et benzène-formamide. Le but de ce contrôle est de vérifier la pureté des extraits.

a) *Extraction par l'alcool absolu.*

— On prend 10 comprimés à base d'hydrocortisone, on pèse, le poids total est de 1 510 mg. On les pulvérise, on prend 151 mg exactement pesés de la poudre obtenue qui correspond théoriquement à 10 mg d'hydrocortisone.

— Dans un ballon jaugé à 100 ml à long col, on introduit :

- 151 mg de poudre,
- 75 ml d'alcool absolu.

— On soumet le ballon à un agitateur électrique pendant 1 heure. Ensuite, on complète avec de l'alcool absolu le contenu du ballon à 100 ml, on mélange soigneusement et on filtre.

b) *Extraction par le chloroforme.*

— Une prise d'essai de 151 mg exactement pesés de poudre est entraînée avec 15 ml d'eau distillée dans une ampoule à

(*) Le mode opératoire de ces réactions sera exposé dans le chapitre suivant.

décantation. On agite par retournements pendant 15 minutes. Ensuite, on ajoute 30 ml de chloroforme et on agite fortement pendant 15 minutes. On laisse décanter et on soutire la phase chloroformique ; cette dernière opération est renouvelée 3 fois encore, chaque fois avec 20 ml de chloroforme. La phase chloroformique réunie est recueillie dans un cristalliseur à large bord. On laisse ensuite le chloroforme s'évaporer toute la nuit à la température du laboratoire. Le lendemain, le résidu formé de cristaux blancs et soyeux est repris par l'alcool absolu en plusieurs fois pour obtenir exactement 100 ml après homogénéisation par agitation. La solution est filtrée.

c) *Comparaison des résultats.*

Les teneurs en hydrocortisone dans les deux solutions obtenues sont évaluées sur des parties aliquotes en utilisant les réactions citées plus haut. Les résultats qui figurent dans le tableau ci-dessous sont les moyennes faites sur trois extractions pour chaque méthode, pour chaque essai ; trois réactions employées donnent des résultats analogues en teneur en hydrocortisone.

Taux théorique en microgramme		10	20	30	40	50
Extraction par alcool absolu	Quantité trouvée .	11	22	32	44	55
	% de récupération	110	110	106,6	110	110
Extraction par le chloroforme	Quantité trouvée .	11	21	31,5	42	52,5
	% de récupération	110	106,5	105	105	105

Il ressort de ce tableau :

a) On a trouvé dans les 2 cas un taux d'hydrocortisone supérieur de 10 % dans la méthode A et d'environ 5 % dans la méthode B, au taux théorique annoncé par le fabricant. Ceci pourrait paraître surprenant au premier abord, mais il faut savoir que ce taux supérieur à la normale correspond à une tolérance prévue par certaines pharmacopées.

b) L'extraction directe par l'alcool absolu s'accompagne d'un taux de récupération supérieur d'environ 5 % à celui trouvé par la méthode B.

c) La dispersion des résultats est plus grande dans la méthode B.

La pureté du produit d'extraction a été vérifiée par chromatographie sur papier dans les systèmes benzène-formamide et chloroforme-formamide. Pour chaque extrait, on ne met en évidence qu'un seul spot positif avec les réactions au bleu de tétrazolium, I. N. H. et situé sur les chromatogrammes au même niveau que les témoins d'hydrocortisone.

2° Applications au dosage des cortico-stéroïdes dans les poudres à granuler.

Ainsi l'extraction directe par l'alcool absolu semble donner un résultat légèrement supérieur à celle utilisant le chloroforme. Nous avons donc procédé à l'extraction de l'hydrocortisone et de la prédnisone de nos mélanges par de l'alcool absolu. Les extraits obtenus (numérotés comme les mélanges de poudre), sont soumis aux contrôles effectués par les mêmes réactions que précédemment.

— Les résultats donnés par les trois réactions, réactions de Porter et Silber, absorption en U. V. à 241 m μ , réaction à l'I. N. H. sont satisfaisants pour les extraits provenant des mélanges I, III, IV, V, I bis, III bis, IV bis, V bis.

Mais les extraits obtenus à partir des mélanges II et II bis ont montré une anomalie importante concernant leur comportement vis-à-vis du réactif de Porter et Silber, en effet, la coloration obtenue avec ces deux extraits est différente déjà à l'œil nu de la coloration donnée par les autres extraits ; elle est jaune foncé et non jaune citron. La mesure de la densité optique à 410 m μ donne des chiffres de 40 % environ plus élevés que ceux qui sont obtenus avec les autres extraits. Pour les mélanges II et II bis, l'extraction des principes actifs sera donc réalisée avec le chloroforme RP, selon la méthode B.

Interférences des excipients.

1) Les extraits alcooliques III et III bis semblent contenir une faible quantité d'acide citrique utilisé comme excipient, ceci se traduit de façon suivante ;

— Quand on fait la mesure de la densité optique de l'absorption en U. V. à 241 m μ , on constate une légère augmentation, d'environ 2 % par rapport à la densité donnée par les autres extraits. Mais cette augmentation est linéaire, puisque la courbe de dosage effectuée sur 5 concentrations croissantes reste une droite.

— L'acide citrique se retrouve sur le chromatogramme sous forme d'une tache entourant le point de dépôt de l'extrait, qui présente une fluorescence blanc glacé aux U. V. à 255 m μ , après traitement par pulvérisation au réactif indicateur de pH, telle la solution de pourpre de bromocrésol, avec laquelle on obtient une coloration jaune intense. Cependant, cette présence de l'acide citrique ne modifie pas le comportement chromatographique du cortico-stéroïde.

2) Les substances contenues dans les formules II et II bis, qui pourraient être entraînées ou dissoutes par l'alcool et qui gênent la réaction de Porter et Silber, semblent être le lactose et le saccharose. Nous pensons plus spécialement à ce dernier, dont la molécule se compose d'un glucose (gluco-pyranose) et d'un fructose (fructofuranose). Or, le fructose possède dans sa molécule un groupement α -cétolique semblable à la chaîne latérale des cortico-stéroïdes étudiés.

Nous avons confirmé expérimentalement cette hypothèse de la façon suivante : le lactose et le saccharose sont mis séparément en suspension dans l'alcool absolu et soumis à une agitation identique à celle utilisée pour les comprimés. Après décantation et filtration, nous pratiquons sur les filtrats obtenus la réaction de Porter et Silber. Le filtrat provenant de la suspension du lactose ne donne qu'une légère fluorescence jaune, alors que le filtrat provenant de la suspension du saccharose donne une coloration jaune foncé intense.

Le saccharose est assez soluble dans l'alcool (près de 1 %) pour gêner la réaction de Porter et Silber.

*
**

1) La solubilisation directe du cortico-stéroïde dans l'alcool absolu donne un résultat légèrement supérieur à celui de l'extraction chloroformique de la suspension aqueuse de la poudre.

2) L'extraction du stéroïde des mélanges I, III, IV, V, I bis, III bis, IV bis et V bis peut être réalisée par l'alcool absolu, aucun des constituants de l'extrait n'intervenant dans les 3 réactions de dosage utilisées.

3) Par contre, les mélanges II et II bis, qui contiennent du saccharose, doivent être traités par la méthode au chloroforme, car le saccharose interfère dans la réaction de Porter et Silber et ce sucre est relativement soluble dans l'alcool.

4) L'acide citrique contenu dans les formules III et III bis est faiblement solubilisé par l'alcool et ceci fait augmenter légèrement la densité optique dans le dosage par spectrophotométrie en U. V. à 241 m μ , mais n'intervient pas dans les réactions.

CHAPITRE IX

EXPOSE TECHNIQUE DES METHODES RETENUES POUR LES MESURES QUANTITATIVES

1. — CHOIX DES METHODES

Nous avons tenu compte dans le dosage des cortico-stéroïdes dans les poudres composées des conclusions de notre étude bibliographique.

Un résultat n'est valable que s'il est recoupé par plusieurs méthodes, chacune appréhendant une des caractéristiques de la molécule de cortico-stéroïdes, soit la séquence Δ -4,3 céto ou Δ 1,4-3 céto du noyau A, soit la séquence α -céto, ici 17 α , 21-diol 20-one. Un résultat reposant sur une seule méthode, c'est-à-dire mettant en évidence une seule des deux séquences, est insuffisant. Seule la conjonction des deux évaluations, où entrent en jeu les deux séquences, peut donner un résultat satisfaisant.

Aussi avons-nous retenu trois critères.

1) La réaction de Porter et Silber, considérée comme spécifique de la chaîne latérale 17 α , 21 - dihydroxy 20 - cétone.

2) Le spectre d'absorption en U. V. à 241 m μ .

3) La réaction à l'hydrazide de l'acide isonicotinique (I. N. H.).

Ces deux dernières réactions sont spécifiques du groupement Δ 4-3 céto ou Δ 1,4-3 céto du noyau A.

Dans tous les cas, nous avons mesuré la densité optique au spectrophotomètre Jobin et Yvon, en utilisant des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur.

A. — Dosage basé sur la présence du groupement 17 α , 21 - Diol 20 one.

Réaction de Porter et Silber (143).

Principe : Les stéroïdes possédant dans la chaîne latérale le groupement 17 α , 21 dihydroxy 20 cétone donnent une réaction colorée jaune présentant un maximum d'absorption à 410 m μ , lorsqu'ils sont chauffés en milieu sulfurique en présence de chlorhydrate de phényl-hydrazine.

La spécificité et le mécanisme de la réaction de Porter et Silber ont été étudiés au chapitre IV.

Réactifs :

1) Solution à 62 p. 100 en volume dans l'eau distillée d'acide sulfurique pur pour analyse (2 = 1,83).

2) Réactif de Porter et Silber : solution de chlorhydrate de phényl hydrazine pur Merck à 65 mg dans 100 ml du réactif 1.

Le réactif 2 doit être conservé à la glacière dans des flacons teintés bouchés à l'émeri. Durée de conservation : environ 15 jours.

3) Alcool éthylique absolu R. P.

Remarque. — La pureté de l'alcool éthylique est primordiale. Nous avons eu en effet des ennuis avec certains lots d'alcool absolu du commerce qui réagissaient avec le réactif de Porter et Silber (tube témoin de la réaction) en donnant une coloration jaune apparemment identique à celle développée par les cortico-stéroïdes (la présence d'aldéhyde, même à l'état de trace, doit faire proscrire l'alcool).

Protocole opératoire :

La réaction est réalisée dans des tubes en verre Pyrex de 50 ml munis de bouchons en verre rodé.

On introduit dans le tube une quantité connue, inférieure ou égale à 2 ml, d'extrait alcoolique à doser ; on complète le volume à 2 ml avec l'alcool absolu. A ce tube et à un autre tube témoin ne contenant que l'alcool absolu 2 ml, on ajoute 2 ml de

réactif de Porter et Silber. Ces tubes bouchés et dont le contenu est mélangé par retournements sont placés au bain-marie à 60° C pendant exactement 30 minutes. Après ces 30 minutes, on mesure, après refroidissement sous un courant d'eau pour stabiliser la réaction, la densité optique au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 410 m μ .

B. — Dosage basé sur l'insaturation du noyau A.

1. Mesure de la densité optique de l'absorption U. V. en solution méthanolique.

Principe : Les stéroïdes à noyau A insaturé absorbent fortement la lumière ultra-violette ; en solution alcoolique (méthanolique ou éthylique), cette absorption est maximum dans la région comprise entre 239-242 m μ , pour les cortico-stéroïdes anti-inflammatoires. Cette propriété permet la détection et surtout le dosage de ces derniers.

Protocole opératoire :

a) Dans des tubes de verre Pyrex de 5 ml et munis de bouchons en verre rodé, on met l'extrait alcoolique en quantité connue. On procède ensuite à l'évaporation de l'alcool à l'aide d'un courant d'air.

b) Au résidu de chaque tube ci-dessus, on ajoute 3 ml d'alcool méthylique absolu R. P. Après agitation pour dissoudre le résidu et homogénéiser la solution, on procède à la mesure de la densité optique à la longueur d'onde 241 m μ .

2. Réaction à l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique (173) (50).

Principe :

a) Le groupement Δ -4-3 cétostéroïde réagit avec l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique en solution méthanolique en donnant une coloration jaune présentant un maximum d'absorption à 380 m μ .

b) Le groupement Δ -1,4-3 cétostéroïde réagit avec l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique en solution concentrée méthana-

50 CINGOLANI E., CAVINA G., AMORMINO V. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, n° 5, 301-310.

173 UMBERGER E. J. — *Annal. Chem.*, 1955, 27, 768-773.

nolique en donnant une coloration jaune présentant un maximum d'absorption à 405 m μ . On utilisera donc 2 réactifs, l'un à faible concentration en hydrazide de l'acide iso-nicotinique pour le dosage de l'hydrocortisone, l'autre beaucoup plus concentré pour le dosage de la prédnisone, car le groupement Δ 1,4-3 céto-stéroïdes ne réagit qu'en présence de l'excès de l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique et en plus, la réaction n'atteint son maximum d'intensité qu'après un temps assez long (3 heures).

Réactifs :

a) Réactif destiné au dosage du groupement Δ -4-3 céto-stéroïdes (hydrocortisone).

— Hydrazide de l'acide iso-nicotinique pur : 100 mg.

— Acide chlorhydrique concentré : 0,125 ml.

— Alcool méthylique absolu R. P. q. s. p. : 100 ml.

b) Réactif destiné au dosage du groupement Δ -1,4-3 céto-stéroïde (prédnisone).

— Hydrazide de l'acide isonicotinique : 800 mg.

— Acide chlorydrique concentré : 1 ml.

— Alcool méthylique absolu R. P. q. s. p. : 100 ml.

Ces 2 réactifs sont utilisés de préférence fraîchement préparés. A la rigueur, le réactif *a* peut être conservé à + 4° C pendant une semaine ; quant au réactif *b*, il est impossible de le conserver même à + 4° C ; en effet, l'hydrazide de l'acide isonicotinique précipite déjà abondamment après 24 heures de conservation.

Protocole opératoire :

— Les extraits éthanoliques de stéroïdes sont évaporés et le résidu est repris par l'alcool méthylique.

a) *Evaporation.*

Dans de tubes en verre Pyrex de 5 ml, on introduit des volumes connus de solution à doser. On évapore ensuite le contenu de ces tubes à l'aide d'un courant d'air.

b) *Réaction.*

Dans chacun des tubes précédents et dans un dernier servant de témoin, on ajoute successivement :

- 2 ml d'alcool méthylique absolu R. P. ;
- 2 ml de réactif à l'I. N. H.

Les tubes, bouchés et retournés plusieurs fois pour bien mélanger le contenu, sont mis au bain-marie à 25° C. Ce séjour au bain-marie est de 1 heure exactement pour le cas du dosage de l'hydrocortisone et de 3 heures exactement dans le cas du dosage de la prédnisone.

Lecture :

Elle a lieu, pour les tubes renfermant l'hydrocortisone, à la longueur d'onde de 380 m μ , et pour les tubes renfermant la prédnisone à la longueur d'onde de 405 m μ .

2. — ETALONNAGE.

Les courbes étalons ont été réalisées avec les solutions suivantes :

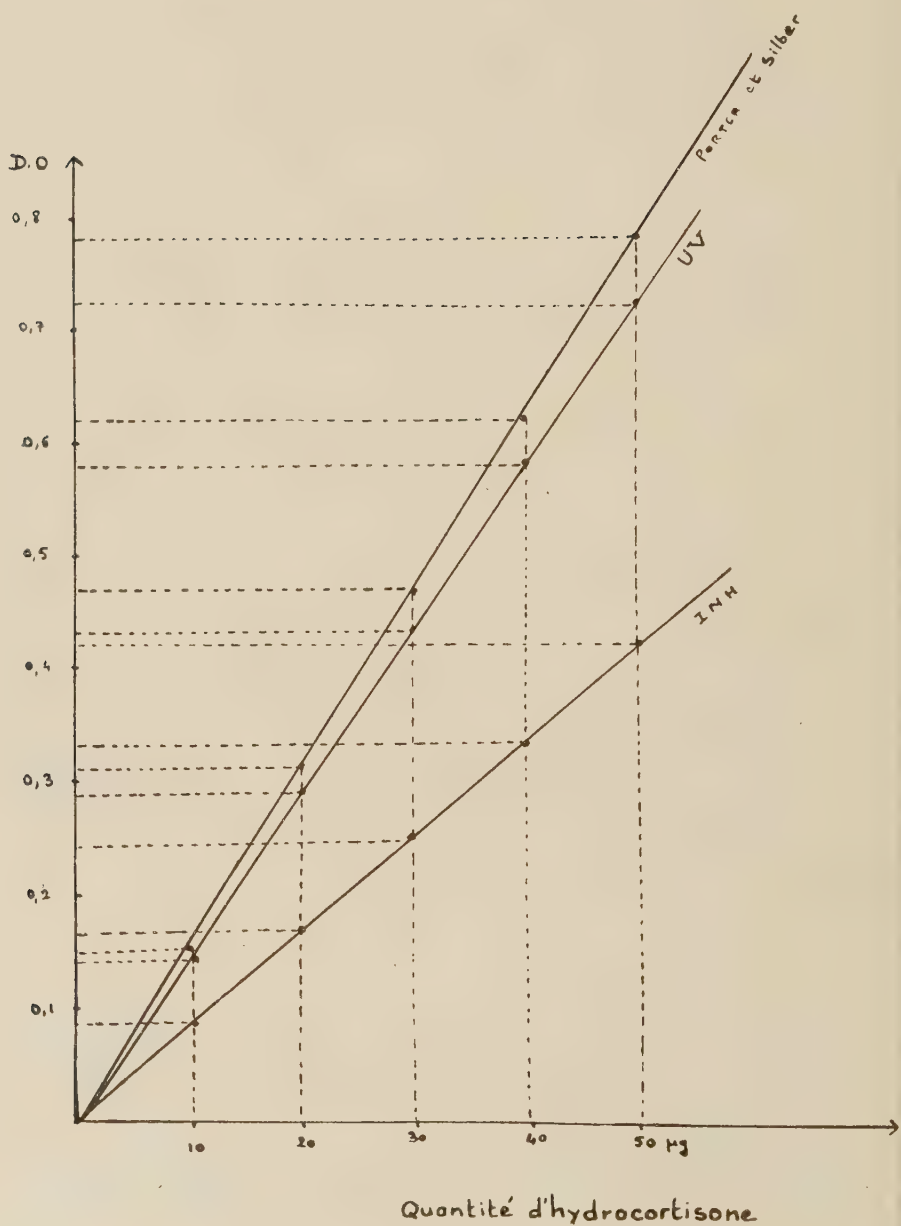
La solution d'hydrocortisone à 100 μ g/ml est obtenue par dissolution de 10 mg d'hydrocortisone microfine (Roussel-Uclaf, Paris), dans 100 ml d'alcool éthylique absolu.

Valeurs des densités optiques pour l'étalonnage de l'hydrocortisone.

Le tableau suivant rassemble les valeurs des densités optiques obtenues pour des concentrations croissantes et connues d'hydrocortisone dans chacune des 3 réactions de dosage utilisées. On retrouvera ces valeurs sur le graphique ci-contre :

Quantité d'hydrocortisone (en μ g)	10	20	30	40	50
Densité optique de la réaction de Porter et Silber (lecture à 410 m μ)	0,150	0,310	0,470	0,620	0,780
Densité optique de la réaction à l'I. N. H. (lecture à 380 m μ) ..	0,085	0,165	0,250	0,330	0,420
Densité optique de l'absorption ultra-violet à 241 m μ	0,145	0,290	0,435	0,580	0,780

COURBES ETALONS D'HYDROCORTISONE



La solution de prédnisone à 100 μ g/ml est obtenue par dissolution de 10 mg de prédnisone microfine (Roussel-Uclaf, Paris), dans 100 ml d'alcool éthylique absolu.

Valeurs des densités optiques pour l'étalonnage de la prédnisone.

Le tableau suivant rassemble les valeurs de densités optiques obtenues pour des concentrations croissantes et connues de prédnisone dans chacune des 3 réactions de dosage utilisées.

Quantité de prédnisone (en μ g)	10	20	30	40	50
Densité optique de la réaction de Porter et Silber (lecture à 410 m μ)	0,165	0,330	0,505	0,670	0,830
Densité optique de la réaction à l'I. N. H. (lecture à 405 m μ) .	0,090	0,185	0,280	0,370	0,470
Densité optique de l'absorption ultra-violet à 240 m μ	0,145	0,295	0,435	0,580	0,720

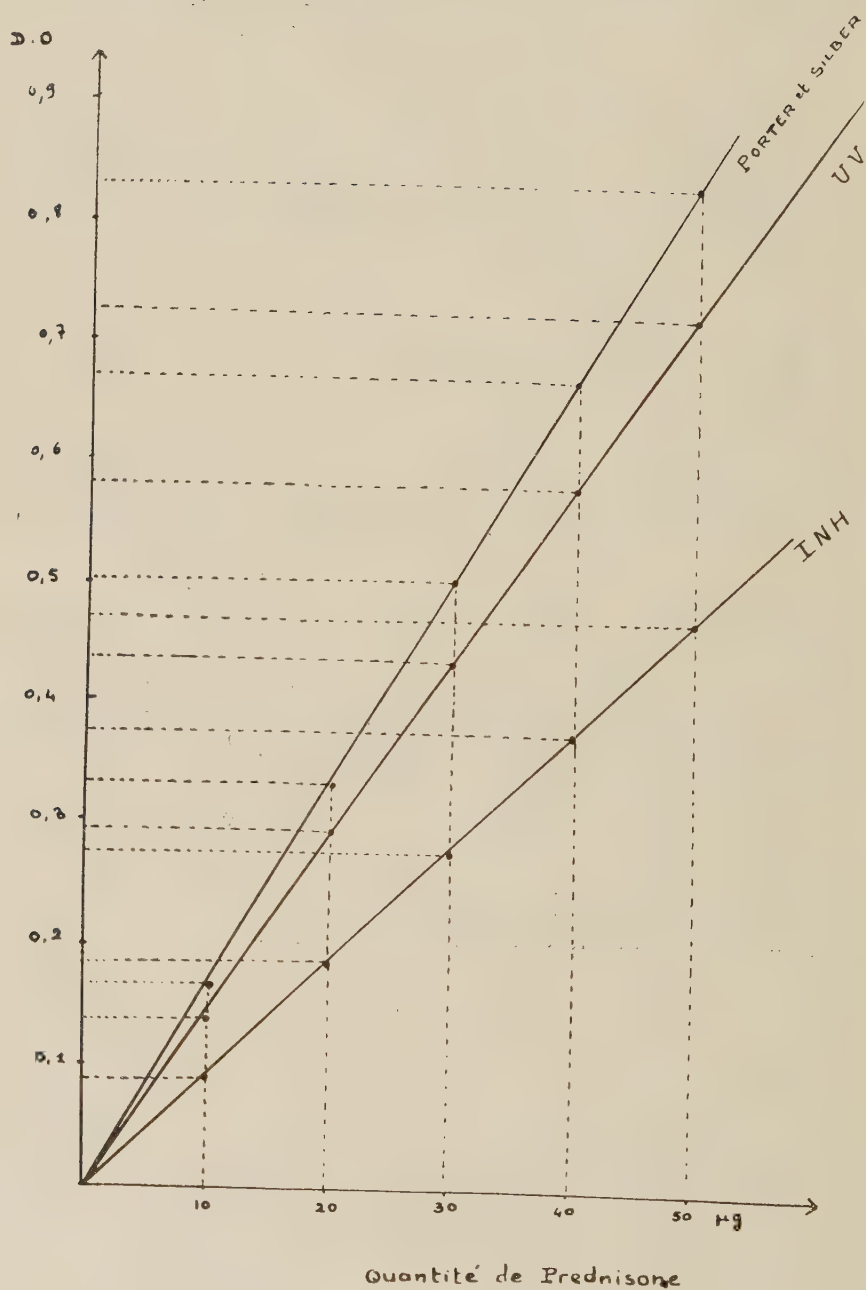
Bien qu'il s'agisse seulement ici de l'établissement des courbes d'étalon, il est permis de constater :

— A concentration égale, il n'existe pas de différence importante entre les densités optiques obtenues pour l'un et l'autre stéroïde dans chacune des 3 réactions.

— Pour un même stéroïde, la sensibilité des 3 réactions est assez voisine.

— La réaction de Porter et Silber est légèrement plus intense pour la prédnisone que pour l'hydrocortisone.

COURBES ETALONS DE PREDNISONNE



CHAPITRE X

COMPOTEMENT DES STEROIDES EN MILIEU SOLIDE COMPLEXE APRES SEJOUR A DIFFERENTES TEMPERATURES

1° Protocole expérimental et résultats.

1) Des prélèvements sont effectués à date déterminée et le protocole opératoire exposé dans un chapitre précédent est suivi intégralement : l'alcool absolu est utilisé comme solvant d'extraction pour tous les mélanges, sauf les mélanges II et II bis ; pour ces derniers, la poudre mise en suspension dans l'eau distillée est extraite par le chloroforme et après évaporation de celui-ci, le résidu est repris par l'alcool absolu.

La prise d'essai de la poudre pour chaque dosage est telle que la concentration théorique en stéroïde de la solution alcoolique soit toujours voisine de 100 μ g/ml.

2) Sur chaque extrait alcoolique, on pratique simultanément la réaction de Porter et Silber, la réaction à l'hydrazide de l'acide iso-nicotinique et l'absorption en solution méthylique à 241 m μ .

Tout contrôle est effectué sur trois prélèvements différents de 0,2, 0,3 et 0,4 ml d'extrait alcoolique qui correspondent respectivement à 20, 30 et 40 μ g de corticoïde.

Soit x, y et z les teneurs en corticoïdes trouvées pour chacun des 3 dosages, il est aisé de calculer le pourcentage de corticoïde présent dans l'échantillon en appliquant la formule suivante :

$$\frac{(x + y + z) \mu g}{90} \times 100 = X \mu g \%$$

Les résultats de dosage de l'hydrocortisone et de prédnisone dans les différents mélanges conservés aux températures fixées

initialement sont rassemblés dans les tableaux suivants. Pour chaque contrôle, ces chiffres expriment la proportion de stéroïde non altérée pour 100 de stéroïde primitif.

Hydrocortisone. — Les tableaux I, II et III concernent la conservation de l'hydrocortisone en mélange de poudres de composition complexe, après séjour plus ou moins prolongé à différentes températures, on constate que :

— La réaction à l'I. N. H. et l'absorption en lumière ultraviolette n'ont pratiquement pas subi de modifications tout au long des 22 mois de conservation.

— Par contre, la réaction de Porter et Silber, qui contrôle l'intégrité de la chaîne latérale, montre une dégradation plus ou moins rapide de cette dernière, mais dans le temps et selon les températures de conservation.

TABLEAU I
Conservation à la température du laboratoire

N° des Mélanges		Temps de conservation exprimé en mois						
		9	12	14	16	18	20	22
I	Réaction	100	99	98		94,5	92	89,5
II	de	100	99	98	96		90	87
III	Porter	100	100	100	100	100	100	
IV	et	100	98,5	96,5	94	91,5	87	83,5
V	Silber	100	98	96		90	86	81,5

TABLEAU II

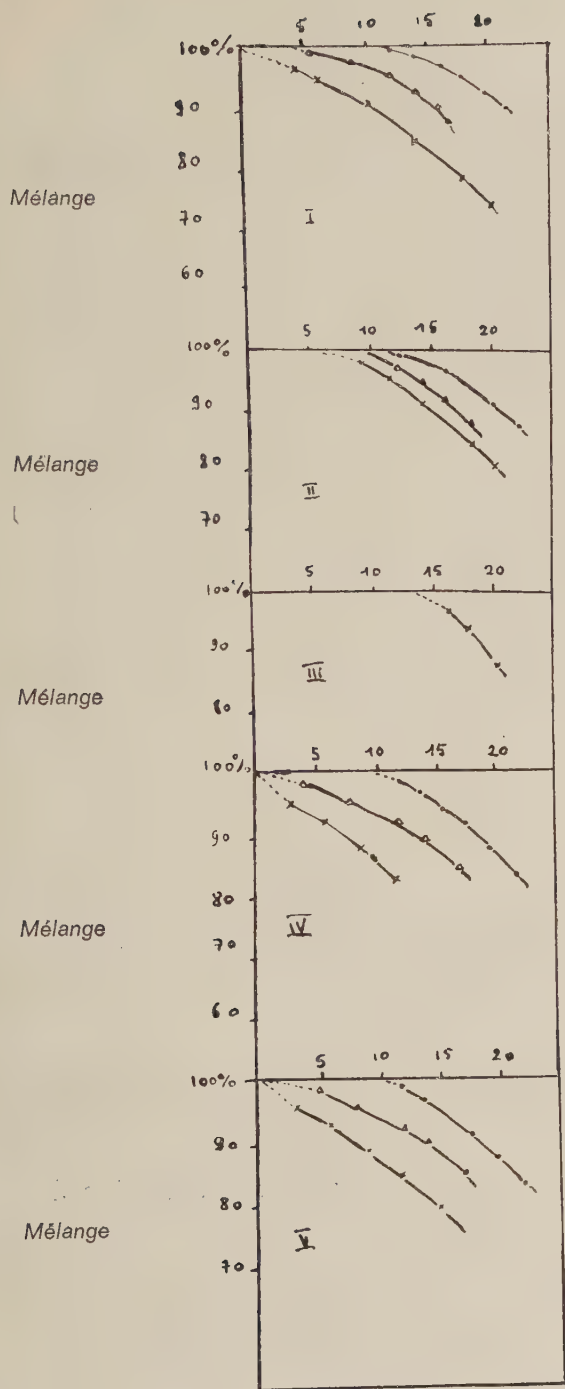
Conservation à la température 37° C

N° des mélanges	Nature des réactions	Temps de conservation exprimé en mois																
		3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	17	18				
I	Porter et Silber	100	100	99	99	98		97		95,5	92,5	89	87					
	I. N. H.	100	100	100	100	100		100		100	100	100	100					
	U. V.	100	100	100	100	100		100		100	100	100	100					
II	Porter et Silber	100	100	100	100	100	100		98,5	97	93,5	90,5		87				
	I. N. H.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	96		93				
	U. V.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100		100				
III	Porter et Silber	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100					
	I. N. H.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100					
	U. V.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100					
IV	Porter et Silber	100	98,5		96		94,5			92,5	89		84,2					
	I. N. H.	100	100		100		100			97,5	95,5		92					
	U. V.	100	100		100		100			100	100		100					
V	Porter et Silber	100	99	98,5			95			91,5	88,5		84,1					
	I. N. H.	100	100	100			100			100	95		91					
	U. V.	100	100	100			100			100	100		100					

TABLEAU III

Conservation à l'étuve à 50° C

N° des mélanges	Nature des réactions	Temps de conservation en mois											
		2	3	4	6	8	9	10	12	14	16	18	20
I	Porter et Silber	100	100	96	94,5		90,5	90,5		84		78	73,5
	I. N. H.	100	100	100	100		100	100		100		100	100
	U. V.	100	100	100	100		100	100		100		100	100
II	Porter et Silber	100	100	100	100	98,5	98		93,5	91		84	80,5
	I. N. H.	100	100	100	100	100	100		100	100		100	100
	U. V.	100	100	100	100	100	100		100	100		100	100
III	Porter et Silber	100	100	100	100	100	100		100	100	96	92	87
	I. N. H.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100
	U. V.	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100
IV	Porter et Silber	100	95,5	94	92		88		83				
	I. N. H.	100	100	100	100		100		100				
	U. V.	100	100	100	100		100		100				
V	Porter et Silber	100	95	95	92		88		84				
	I. N. H.	100	100	100	100		100		100				
	U. V.	100	100	100	100		100		100				



Courbe de dégradation
de l'hydrocortisone

Réaction Porter-Silber

—•—•— Température du Labo.
- - - - - 37°
x-x-x 50°

Temps de conservation (en mois) →

Courbes de dégradation de l'Hydrocortisone.

— Ces courbes permettent de visualiser et de comparer la dégradation de l'hydrocortisone à différentes températures de conservation et dans différents mélanges.

Dans le mélange III, la dégradation de l'hydrocortisone n'est importante qu'à la température de 50° C. A température ordinaire et à 37° C, la conservation est parfaite.

L'examen de chacun des tableaux concernant l'hydrocortisone suggère les commentaires ci-après :

1° Conservation à la température du laboratoire (Tableau I).

a) Pour tous les mélanges, la conservation apparaît satisfaisante pendant au moins un an. Par la suite, il se fait une certaine dégradation de la chaîne latérale de l'hydrocortisone, notamment pour les mélanges IV et V.

b) Le pourcentage de destruction de l'hydrocortisone évalué par la réaction de Porter et Silber pris par exemple après 22 mois de conservation est de :

Mélange N°	Pourcentage de perte
I	10,5 %
II	13 %
IV	16,5 %
V	18,5 %

c) Seul le mélange III renferme, après 20 mois de conservation, la teneur théorique d'hydrocortisone.

2° Conservation à l'étuve à 37° (Tableau II).

a) Selon la réaction de Porter et Silber, une dégradation est déjà constatée, minime, dès le 4^e et 5^e mois, pour les mélanges IV et V, plus tardivement pour les mélanges I et II.

b) Le pourcentage de dégradation donné par la réaction de Porter et Silber au 17^e mois est de :

Mélange N°	Pourcentage de perte
I	13 %
II	11 %
IV	15,8 %
V	15,9 %

c) Ici encore, la conservation de l'hydrocortisone dans le mélange N° III est excellente, puisqu'au 17^e mois aucune dégradation n'est enregistrée.

3° *Conservation à l'étuve à 50° C* (Tableau III).

a) L'altération de la chaîne latérale débute très précocement pour les mélanges IV et V (selon la réaction de Porter et Silber on trouve déjà 5 % de perte après 3 mois).

Plus tardivement pour les mélanges I et II. Au 16^e mois seulement, le mélange III présente une altération.

b) Le pourcentage de perte au bout de 20 mois est de :

Mélange N°	Pourcentage de perte
I	26,5 %
II	19,5 %
III	13 %

et au 12^e mois pour les mélanges

IV	17 %
V	16 %

Quelle que soit la température, la dégradation de l'hydrocortisone correspond uniquement à l'altération de la chaîne latérale. La structure α - β insaturée du noyau A (groupement Δ 4-3 cétone n'est pas modifiée, puisque la réaction de l'I. N. H. et le spectre méthylique à 241 m μ fournissent des résultats théoriques.

Prédnisone. — Les tableaux de chiffres ci-dessous concernent la conservation de la prédnisone en mélanges de poudres de composition complexe après séjours plus ou moins prolongés à différentes températures.

Selon les réactions à l'I. N. H. ou bien l'absorption en lumière ultra-violette, les quantités de prédnisone attendues ont toujours été intégralement retrouvées tout au long de la conservation.

Par contre, la réaction de Porter et Silber nous a donné des résultats qui méritent d'être mentionnés.

TABLEAU IV

Conservation à la température du laboratoire

N° des mélanges	Réaction	Temps de conservation exprimé en mois							
		4	5	6	9	14	18	20	22
I bis	Porter et Silber	100	98		97	94	88	83,5	79
II bis		100	98	98	97	96	90	86	80
III bis		100	100	100	100	100	98	96	
IV bis		100	97	96	95	92	88	85	79,5
V bis		100	97	96	94	88,5	86,5	82	76

TABLEAU V

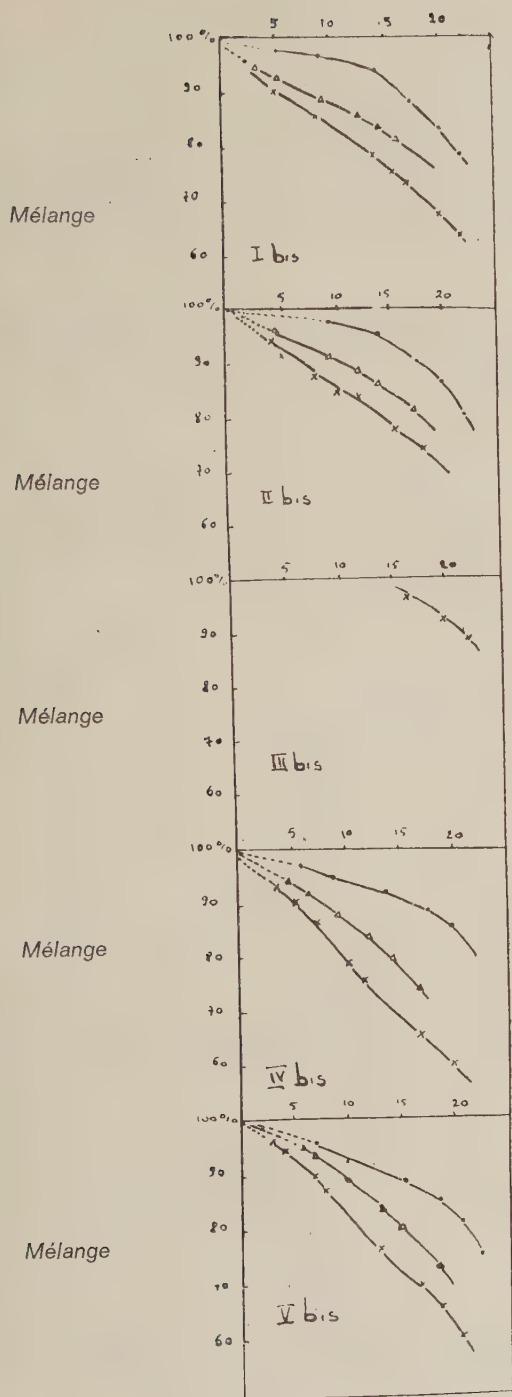
Conservation à la température à 37° C

N° des mélanges	Nature des réactions	Temps de conservation exprimé en mois										
		2	3	4	5	6	9	12	14	16	17	
I bis	Porter et Silber	100	95	95	92		88	86	84		80	
II bis		100	100	100	97		91	88	85,5		81	
III bis		100	100	100	100		100	100	100	99		
IV bis		100	100	94,5		91,5	88	83,5	80		74,5	
V bis		100	100	96		95	90	85	80		73	

TABLEAU VI

Conservation à la température à 50° C

N° des mélanges	Nature des réactions	Temps de conservation exprimé en mois																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	17	18	20	22
I bis ..	Porter et Silber	100	100	95	95	91				86,5				79	75,5	73,5		67,5	6
II bis ..		100	100	100	94	91			87,5		85		83	80				74	
III bis ..		100	100	100	100	100		100		100			100	100	97			96	92
IV bis ..		100	95	93		90		87,5			79	76					65		58,5
V bis ..		100	97	95			90	87,5						77	70			66	60



Courbe de dégradation
de la prednisone
Réaction Porter-Silber

●—● Température de Labo
▲—▲ 37°
x—x 50°

Temps de conservation (en mois) →

Courbes de dégradation de la prédnisone.

Comme précédemment avec l'hydrocortisone, la dégradation de la prédnisone à différentes températures de conservation et dans différents mélanges est représentée par les courbes ci-contre :

La confrontation des résultats concernant la prédnisone appréciée par la réaction de Porter et Silber suggère les commentaires suivants :

1° Conservation à la température du laboratoire (Tableau IV).

a) La dégradation apparaît un peu plus rapidement que dans le cas de l'hydrocortisone. Pourtant, le mélange III bis résiste bien au delà d'un an, puisque les premières modifications ne sont marquées qu'à partir de 18 mois.

b) Le pourcentage de dégradation au 20^e mois par exemple est de :

<i>N° du mélange</i>	<i>Pourcentage de perte</i>
I bis	16,5 %
II bis	16 %
III bis	4 %
IV bis	15 %
V bis	18 %

2° Conservation à l'étuve à 37° C (Tableau V).

a) La dégradation commence un peu plus précocement qu'à température ordinaire.

b) Le pourcentage de perte au 17^e mois est :

<i>N° du mélange</i>	<i>Pourcentage de perte</i>
I bis	20 %
II bis	19 %
IV bis	25,5 %
V bis	27 %

Au 16^e mois le mélange N° III bis ne présentait pratiquement pas de perte.

3° Conservation à 50° C (Tableau VI).

a) La dégradation commence encore plus précocement qu'à température ordinaire et à 37°, puisque la réaction de Porter et Silber témoigne d'altérations dès le 2^e ou le 3^e mois au moins pour les mélanges I bis, IV bis et V bis.

b) Les pourcentages de dégradation sont beaucoup plus élevés que précédemment : par exemple au 20^e mois ils sont de :

N° du mélange	Pourcentage de perte
I bis	32,5 %
II bis	26 %
III bis	8 %
IV bis	41,5 %
V bis	40 %

2° Discussion des résultats de l'analyse quantitative.

a) *La dégradation* de l'hydrocortisone et de la prédnisone dans tous les mélanges étudiés *ne concerne que la seule chaîne latérale* 17 α , 21 - dihydroxy 20 - cétone. Cette séquence confère à la molécule une grande fragilité qui est capable de se manifester même en milieu solide. Ce comportement, qui peut surprendre, ne fait toutefois que confirmer les études réalisées en milieu liquide, seule la vitesse de la réaction est différente.

Par contre, les divers contrôles effectués n'ont pas permis de mettre en évidence une différence marquée entre la résistance du groupement Δ 1,4 - 3 cétone et celle du groupement Δ - 4 - 3 cétone en fonction des variables étudiées.

b) Le délai au bout duquel se manifeste une dégradation est variable avec la *nature du cortico-stéroïde* et la *température de la conservation*. A la température du laboratoire, l'hydrocortisone sous forme de poudre à comprimer est stable quel que soit le milieu pendant environ un an alors que l'altération de la prédnisone débute plus précocement.

Si la conservation a lieu à température plus élevée, la dégradation de ces 2 molécules apparaît plus rapidement, mais les

vitesse de réactions semblent voisines, puisque les courbes de dégradations sont sensiblement parallèles. Si le pourcentage de prédnisone détruit à 37° C et à 50° C est pour chaque mélange, supérieur à celui de l'hydrocortisone, il faut rappeler que la prédnisone est, dès la température ordinaire, plus fragile que l'hydrocortisone.

c) Influence des excipients.

— Les études réalisées en milieu liquide avaient montré le rôle primordial joué par le pH du milieu sur la conservation des cortico-stéroïdes. Partant de ces données, nous avons choisi, pour notre étude, des mélanges variés dont deux contenaient des substances susceptibles d'assurer au milieu un pH très différent de la neutralité. La formule n° 1 (mélanges I et I bis) contenait une forte proportion de magnésie calcinée qui assurait à sa suspension aqueuse une réaction alcaline à pH 10,2 ; la formule n° 3 (mélanges III et III bis) est constituée pour la moitié de sa masse d'acide citrique qui confère une réaction acide à pH 2,2 à sa suspension aqueuse ; la formule n° 2 ne contenait que des substances organiques sans effet sur le pH du milieu ; les formules n°s 4 et 5 renfermaient du phosphate bi-calcique destiné à leur assurer un pH voisin de la neutralité par effet tampon.

En tenant compte des études portant sur la stabilité des corticostéroïdes en solution, on devait s'attendre à trouver une dégradation de l'hydrocortisone et de la prédnisone préférentiellement dans les mélanges I, I bis, III et III bis, alors que la conservation devait être satisfaisante pour les mélanges II, IV, V, II bis, IV bis et V bis. Or, les résultats rassemblés dans les pages précédentes viennent contredire formellement l'hypothèse ci-dessus.

La dégradation, on l'a vu, atteint uniquement la chaîne latérale, malgré la présence dans les mélanges de substances alcalines et la durée de la conservation. La conservation de l'hydrocortisone et de la prédnisone dans les mélanges III et III bis est excellente, puisqu'après 22 mois de conservation à la température du laboratoire et 17 mois à l'étuve à 37°, la chaîne latérale n'a pas subi d'altération. Il faut l'intervention de la température à 50° C et plus d'un an de conservation pour voir s'amorcer l'oxydation de la chaîne latérale. Pour les autres mélanges, les pourcentages de destruction sont relativement

voisins, plus marqués toutefois pour les mélanges de formule n° 5 que pour les mélanges de formule n° 1 et n° 2.

— Par quel mécanisme peut-on expliquer l'action protectrice des constituants de la formule n° 3 vis-à-vis de l'oxydation des corticostéroïdes étudiés ?

1) L'acide citrique, principal constituant des mélanges III et III bis, est, on le sait, un agent acidulant, séquestrant et anti-oxydant (177') (193). Il ne semble cependant pas que la première propriété évoquée soit responsable de la protection des corticostéroïdes ; on a vu en effet que le facteur pH ne paraissait pas influencer d'une façon notable la dégradation des corticoïdes en milieu solide. De plus, l'influence des ions H^+ sur la conservation des corticostéroïdes en milieu liquide peut entraîner une incorporation partielle de la chaîne latérale dans le cycle D, conduisant à un D-homo-stéroïde. Cette action protectrice de l'acide citrique résulte vraisemblablement de ses propriétés anti-oxydante et séquestrante. L'action anti-oxydante de l'acide citrique est en réalité une action anti-oxydante indirecte (177''), synergique des anti-oxydants vrais, en effet, cet acide apparaît capable de complexer les ions métalliques qui interviennent comme catalyseurs d'oxydation de nombreuses substances. Cette propriété séquestrante est liée à la présence du groupement hydroxyle, les groupements carboxyliques pouvant exercer une attraction sur un ou plusieurs éléments métalliques. Elle est mise à profit dans la conservation alimentaire (177''') et de médicaments, en particulier de l'acide ascorbique (128').

— La chaîne latérale hydroxy-cétolique de l'hydrocortisone et de ses dérivés présente une grande sensibilité aux agents catalyseurs d'oxydation. Ainsi, LEW-BART et MATTOX (116) ont mis

116 MARVIN C., LEW BART M.L. et MATTOX W.R. — *Nature*, 1959, 183, 820-21.

128' NOFFRE C. — Etude de la dégradation et de la stabilisation de l'acéscorbique en solution aqueuse. *Thèse Pharmacie* (Etat), Lyon, 1960.

177 VINCENT-SCHWAL H. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1961, 19, 673-77.

177' VIGNERON A. — Autoxydation. Mesures de préventions : Antioxydants. *Soc. Ed. Pharmacie et Sci.*, p. 29.

177'' *Ibid.*, p. 28.

177''' *Ibid.*, p. 112.

193 6^e Rapport du Comité Mixte F.A.O., O.M.S. d'experts des additifs alimentaires O.M. Rapport technique 1962, 208, 53-54.

en évidence la destruction rapide de cette chaîne latérale en présence de l'ion cuivre en milieu aqueux. On peut donc penser que l'action protectrice de l'acide citrique au sein des mélanges III et III bis, vis-à-vis de l'hydrocortisone et de la prédnisone, s'exerce par son pouvoir anti-oxydant indirect.

2) Dans les mélanges de formule n° 1 et n° 2, la dégradation des stéroïdes apparaît très voisine et manifestement inférieure à celle des mélanges de formule n^{os} 4 et 5. Les formules n^{os} 1, 2, contiennent toutes les deux du lactose associé dans la formule n° 2 à du saccharose. Or, les sucres sont également doués de propriétés anti-oxydantes qui sont mises à profit dans la conservation de l'acide ascorbique. Ces propriétés stabilisantes sont liées à la présence sur les oses ou les diholosides d'un groupement cis- α -diol qui serait susceptible de chélater les éléments métalliques, en particulier le cuivre (128') ; le lactose possède ce groupement, mais le saccharose en est dépourvu.

On peut ainsi expliquer :

— la protection partielle des stéroïdes dans les mélanges de formule n^{os} 1 et 2, par rapport aux mélanges de formules n^{os} 4 et 5.

— La superposition des courbes de dégradation obtenues pour les mélanges I et II, malgré leur différence de composition, constitue un argument supplémentaire en faveur de la dégradation oxydative des stéroïdes dans nos mélanges sous l'influence des traces d'éléments catalyseurs métalliques.

En conclusion, les résultats expérimentaux semblent apporter la preuve de l'action préventive d'une substance anti-oxydante indirecte sur la conservation en milieu solide des cortico-stéroïdes possédant le groupement 17 α , 21 - dihydroxy 20 - céstostéroïde. Ces résultats méritent d'être confirmés par l'emploi d'agents séquestrants similaires tels : l'acide tartrique, l'acide salicylique, l'acide éthylène diamine tétracétique.

CHAPITRE XI

EXPOSE TECHNIQUE DES METHODES RETENUES POUR L'ANALYSE QUALITATIVE

Le contrôle quantitatif dans le temps des corticostéroïdes dans des mélanges de poudres a montré la sensibilité particulière de la chaîne latérale 17- α , 21-dihydroxy 20-cétone des corticostéroïdes à l'action des agents oxydants, alors que la structure insaturée du noyau A paraît résistante aux différentes températures. On est en droit de se demander si la dégradation de la chaîne latérale n'atteint que le carbone 21, ou les deux carbones 20 et 21, ou si elle se répercute sur la structure du noyau cycloperhydrophénanthrénique.

L'analyse qualitative n'a pas seulement pour but de s'assurer de l'identité du corticostéroïde en cause, elle permet aussi de mettre en évidence l'existence de produits de dégradation, de les identifier et ainsi de confirmer les résultats de l'analyse quantitative.

Dans un premier temps, la chromatographie de partage sur papier réalise la séparation des produits de dégradation, et dans un deuxième temps, l'essai d'identification à l'aide des techniques microchimiques doit permettre d'émettre les hypothèses sur la nature des produits formés.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous allons rappeler les techniques que nous avons suivies pour séparer et révéler les cortico-stéroïdes en cause.

A. — Techniques de séparation.

La chromatographie descendante sur papier dont l'emploi s'est généralisé dans l'analyse des mélanges de stéroïdes a été

choisie de préférence à la chromatographie en couches minces : les résultats sont en effet plus reproductibles et, à l'époque où ce travail a été commencé, les données expérimentales étaient beaucoup plus nombreuses.

Nous avons eu recours aux deux types de systèmes de solvants :

1° *Les systèmes du type Zaffaroni.*

Les systèmes choisis initialement étaient :

- chloroforme saturé de formamide ;
- benzène saturé de formamide.

Le système chloroforme-formamide permet une excellente séparation, dans un minimum de temps, des stéroïdes relativement polaires tels que l'hydrocortisone, la prédnisone, qui possèdent 5 atomes d'oxygène dans leur molécule.

Le système benzène-formamide permet une très bonne séparation des stéroïdes moins polaires à 3 ou 4 atomes d'oxygène ; les stéroïdes à 5 atomes d'oxygène demandent, pour être convenablement séparés, au moins 24 heures de migration. Ce système devrait permettre la séparation des produits de dégradation qui sont sensés être moins polaires que les deux stéroïdes étudiés. Mais l'expérience nous a montré que les produits de dégradation ne présentent pas en chromatographie sur papier de polarité très diminuée par rapport aux deux corticostéroïdes initiaux, l'utilisation de ce système n'est donc plus justifiée.

a) *Les solvants.*

- Chloroforme R. P. (contenant 5 p. 1 000 d'éthanol en poids).
- Alcool méthylique absolu R. P.

— Formamide Merck pour chromatographie : malgré le caractère purissime du produit, celui-ci contient des traces d'ammoniaque dont les vapeurs bleuissent le papier au tournesol, la formamide est pour cette raison conservée dans un erlenmeyer sous faible épaisseur, placé dans un dessiccateur au gel de silice.

b) *Appareillage.*

— Cuve en verre de 21 cm de diamètre et de 40 cm de hauteur.

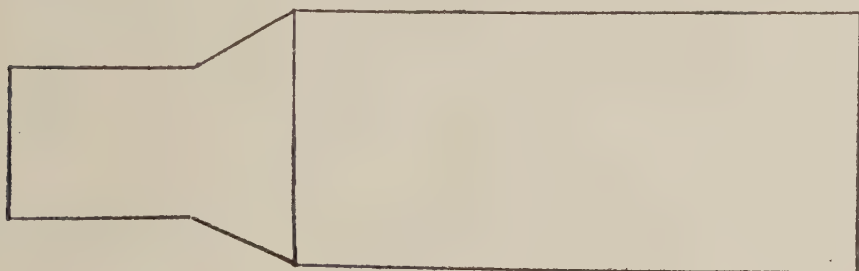
— Couvercle de verre à bords rodés possédant une ouverture pour l'admission des solvants.

— Deux plaques de verre de 12 cm de long et de 10 cm de large.

— Une auge rectangulaire.

— Papier Whatman n° 1.

La bande de papier est découpée, comme l'indique le schéma ci-dessous :



Les solutions témoins de stéroïdes : elles renferment par ml d'éthanol absolu, 100 μ g d'hydrocortisone ou de prédnisone, elles sont conservées en tubes de verre à bouchon rodé à la température de + 4°.

L'hydrocortisone et la prédnisone microfines Roussel-Uclaf sont celles même qui ont été utilisées pour la préparation des mélanges, leur pureté a été vérifiée dans plusieurs systèmes chromatographiques sur papier.

c) *Mode opératoire.*

La phase éluante est constituée de chloroforme R. P. saturé de formamide. Le mélange est maintenu dans une bouteille bouchée à la température ordinaire ; on agite fortement le mélange, on laisse décanter et on soutire la phase chloroformique au moment de l'emploi.

La phase stationnaire est assurée par la formamide ; le papier est imprégné non pas de formamide pure, mais d'un mélange à parties égales de formamide et de méthanol absolu (V : V), puis immédiatement séché entre deux feuilles de papier filtre.

Le dépôt des témoins (40 μ g) et des extraits à analyser est réalisé rapidement, pour éviter la fixation de vapeur d'eau par la formamide.

L'extrémité supérieure de la bande de papier est disposée entre deux plaques de verre qui assurent une migration plus régulière et plus rapide de la phase éluante et qui maintiennent le chromatogramme en évitant le contact avec la paroi de l'auge. La bande de papier est alors suspendue dans la cuve à chromatographie dont le fond est recouvert de chloroforme saturé de formamide. La saturation de la cuve en vapeur de solvant est améliorée en recouvrant les parois d'une feuille de papier filtre, dont la base est immergée dans la phase saturante : la surface d'évaporation est considérablement augmentée.

Après un séjour de 1 heure à 1 h 30 dans la cuve, on introduit la phase éluante par l'orifice situé dans le couvercle.

Les chromatographies sont réalisées à front visible, à la température du laboratoire (environ 25°) ; dans ces conditions, la migration est environ de deux heures.

Le chromatogramme retiré de la cuve est porté à l'étuve ventilée, réglée à 80-90° C, jusqu'à la disparition des vapeurs de formamide (environ 1 heure).

Remarques.

1° La formamide modifie la polarité du papier et les conditions de partage entre le solvant organique et le papier.

2° Dans le mélange formamide-méthanol, ce dernier n'est utilisé que comme diluant de la formamide et n'entre pas dans la constitution de la phase stationnaire. La dilution de la formamide dans le méthanol ou tout autre solvant volatil (acétone), permet de diminuer la quantité de la phase stationnaire fixée sur le papier et d'accélérer la vitesse de migration de la phase éluante et de modifier les R_f des stéroïdes.

3° La préparation du mélange formamide-méthanol doit être réalisée extemporanément, car la dilution de la formamide favorise sa décomposition avec formation de vapeur d'ammoniac.

4° La saturation de la bande de papier, dans le système des solvants du type Zaffaroni, n'est, en général, pas nécessaire, puisque la phase stationnaire imprègne directement le papier,

mais lors du dépôt des extraits alcooliques, la formamide est chassée par l'alcool ; au cours de la période de saturation, il se produit une réimprégnation en formamide des points de dépôt.

5° La formamide, de même que toutes phases stationnaires du système de type Zaffaroni, est difficile à éliminer en totalité, et sa persistance même à l'état de trace, rend impossible l'utilisation de certaines réactions de révélation.

2° *Système de type Bush modifié (133).*

Dans les systèmes de solvants proposés par BUSH, la phase stationnaire est constituée par du papier saturé de vapeur du mélange méthanol-eau, et la phase éluante est représentée par un solvant ou un mélange de solvants organiques saturé de méthanol-eau.

Le système choisi ici est en fait un système du type BUSCH modifié, l'eau est remplacée par une solution d'ammoniaque *N*, et le mélange se compose de :

Chloroforme + Méthanol + Ammoniaque *N* (1 : 1 : 1).

Ce système a l'avantage de permettre la séparation des acides étiéniques, acides formés par oxydation de la chaîne latérale des stéroïdes en C 21. De plus, la phase stationnaire étant constituée par les vapeurs de solvants est plus facile à éliminer : la révélation des chromatogrammes par les réactifs d'identification de la fonction acide (chlorure de thionyle, pourpre de bromocrésol, rouge de phénol), est alors impossible.

a). *Solvants et appareillage.*

Ammoniaque R. P., en plus des solvants utilisés pour le système chloroforme-formamide. Même appareillage que dans le système précédent.

b) *Mode opératoire.*

Les trois constituants du mélange, chloroforme, méthanol et ammoniaque *N* sont mis en équilibre à la température du laboratoire ; la couche chloroformique saturée de méthanol-ammoniaque *N* constitue la phase éluante. La phase aqueuse alcoolique

supérieure est introduite au fond de la cuve et assure la saturation de l'atmosphère de celle-ci.

Après dépôt des extraits à analyser et des témoins, la bande de papier est introduite dans la cuve et on la laisse se saturer pendant 4 heures.

Ensuite, on introduit la phase mobile, la chromatographie est réalisée à front visible, à la température du laboratoire, et exige environ 2 heures. La bande de papier est ensuite suspendue à la température du laboratoire.

Remarque.

La chromatographie employant les systèmes de solvants du type Bush, est en général pratiquée à une température voisine de 34° C, mais certains systèmes fournissent des résultats satisfaisants lorsqu'ils sont utilisés à la température du laboratoire : c'est le cas du système de Bush modifié décrit ici.

B. — Les réactions de révélation.

Le chromatogramme doit être parfaitement sec.

Si le front n'a pas été noté à la sortie de la cuve, on peut le retrouver lors de l'examen du chromatogramme en lumière ultra-violette, soit à 255 m μ , soit à 355 m μ .

Les réactions employées ici sont des réactions spécifiques d'un groupement défini de la molécule de stéroïde.

1° Absorption ultra-violette.

Les stéroïdes porteurs du groupement Δ -4-3 céto et Δ 1,4-3 céto-stéroïdes absorbent fortement le rayonnement ultra-violet aux environs de 255 m μ ; cette propriété permet leur révélation sur les chromatogrammes.

Le chromatogramme sec est placé sous la source lumineuse (lampe à vapeur de mercure, de 255 μ), les spots de l'hydrocortisone et de la prédnisone sont caractérisés par une fluorescence violet sombre sur un fond violet clair.

Remarques.

Après examen et localisation des spots en U. V., le chromatogramme peut être révélé par d'autres réactifs. Il n'en demeure

pas moins que la durée d'irradiation doit être aussi courte que possible.

Il y a lieu d'insister en effet sur la constatation que la fluorescence violet foncé, des spots de prédnisone vire très rapidement (après environ 30 secondes d'exposition) au bleu clair ; cette propriété est utilisée à l'U. S. P. XVI pour caractériser la prédnisone et les Δ -1,4-3 cétostéroïdes et les distinguer des Δ -4-3-cétostéroïdes.

2° Réaction à l'hydrazide de l'acide isonicotinique (50).

Le réactif décrit ici a une teneur en INH intermédiaire entre celles des réactifs de dosage de l'hydrocortisone et de la prédnisone en milieu liquide.

INH	400 mg
HCl concentré R. P.	0,5 ml
Méthanol absolu R. P. q. s. p.	100 ml

Le chromatogramme très sec est pulvérisé avec ce réactif et abandonné au séchage à la température du laboratoire.

Une coloration jaune apparaît presque immédiatement avec les spots d'hydrocortisone, et plus tardivement (15-30 minutes), pour la prédnisone.

Dans les deux cas, la coloration jaune s'accompagne d'une fluorescence jaune intense en lumière de Wood (365 m μ).

Remarques

Le réactif peut être conservé dans les flacons teintés et à basse température pendant environ 15 à 20 jours.

La coloration jaune sur le chromatogramme persiste assez longtemps si on conserve ce dernier entre deux feuilles de papier.

L'utilisation du réactif à l'hydrazide de l'acide isonicotinique peut être suivie de la révélation par le réactif au bleu de tétrazolium.

50 CINGOLANI E., CAVINA G. et AMORMINO V. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, n° 5, 301-310.

3° *Réaction à l'acide phosphorique à 15 %.*

Le chromatogramme sec est pulvérisé avec l'acide phosphorique à 15 % et ensuite mis à l'étuve réglée à 100° pendant 15 minutes.

La présence des corticoïdes se traduit par une fluorescence jaune sous l'action de la lumière de Wood (355 m μ).

4° *Réaction au bleu de tétrazolium.*

La réaction met en évidence le pouvoir réducteur des groupements α -cétoïques de la chaîne latérale.

Réactifs

1° Solution aqueuse à 0,2 p. 100 de bleu de tétrazolium.

2° Solution aqueuse à 10 p. 100 de Na OH en pastilles.

Au moment de l'emploi, on fait un mélange de 2 volumes de réactif *a* avec 1 volume de réactif *b*.

Le chromatogramme sec est pulvérisé avec le mélange, la présence d'hydrocortisone et de prédnisone se traduit par l'apparition d'une coloration bleu violacé. Cette coloration se développe très rapidement, et au bout de 5 à 10 minutes, elle atteint déjà le maximum (sensibilité 5 - 10 μ g/cm²).

Remarques.

Les réactifs *a* et *b* peuvent être conservés séparément pendant un temps assez long (1-2 mois).

Si on veut conserver le chromatogramme, on attend que la coloration se développe au maximum ; on élimine alors l'excès de réactif en laissant le chromatogramme sous un courant d'eau pendant environ 2 minutes, ensuite on le laisse sécher à la température du laboratoire. La coloration est stable plusieurs mois à l'obscurité.

5° *Réaction à la pentanedione (134).*

La réaction consiste à caractériser le formaldéhyde formé par oxydation du groupement α -cétoïque de la chaîne latérale des stéroïdes.

Réactifs.

a) Réactif oxydant :

— Solution aqueuse saturée de périodate de K	1 V
— Alcool éthylique à 95 c	3 V

b) Réactif spécifique de l'aldéhyde formique :

— Acétate d'ammonium R. P.	15 g
— Acide acétique pur	0,30 ml
— 2-4 pentanedione	1 ml
— Alcool méthylique absolu q. s. p.	100 ml

Pour révéler, le chromatogramme sec est pulvérisé par le réactif oxydant *a*, 5 minutes après avec le réactif *b*.

La présence d'hydrocortisone et de prédnisone se traduit par l'apparition d'une coloration jaune brillant, et d'une fluorescence jaune intense sous excitation par U. V. à 255 m μ (sensibilité : 5 μ g/cm²).

6° Réaction à la benzidine.

Elle permet de mettre en évidence la consommation du périodate lors de l'oxydation de la chaîne α -cétole des stéroïdes sur les chromatogrammes.

Réactifs.

a) — Solution aqueuse saturée de périodate de K ..	1 V
— Alcool éthylique à 95 c	3 V
b) — Solution alcoolique à 95 c de benzidine à 0,1 N	10 V
— Acétone R. P.	2 V
— HC1 N/10	2 V

Pour le révéler, le chromatogramme sec est pulvérisé avec la solution *a*, puis 2 minutes après avec le réactif *b*.

La présence de l'hydrocortisone et de la prédnisone se traduit par l'apparition d'une tache blanche sur fond bleu, localisant la disparition du périodate utilisé à l'oxydation des stéroïdes.

7° Réaction de Zimmermann (15).

Elle permet la caractérisation des cétones α -méthylénique, mais ce sont les 17 cétostéroïdes qui fournissent la coloration la plus sensible et la plus spécifique.

Réactifs.

- a) Solution alcoolique à 95 c de potasse 2,5 N.
- b) Solution méthanolique de m-dinitro-benzène à 2 p. 100.

Ces réactifs doivent être préparés au moment de l'emploi.

Le chromatogramme sec est d'abord trempé d'un seul trait dans la potasse alcoolique, l'excès de solution alcaline est éliminé en séchant le chromatogramme entre deux feuilles de papier filtre.

Dans un deuxième temps, le chromatogramme est immergé dans la solution *b* et l'excès du réactif est éliminé comme précédemment.

La présence des 17-cétostéroïdes se traduit par l'apparition, au bout de 10 minutes environ, d'une coloration violette ; le développement de cette coloration est accéléré par passage à l'étuve à 37° C ou par pulvérisation d'air chaud.

Remarques.

Le papier jaunit si la température du développement est trop élevée.

La stabilité de la coloration est réduite à quelques jours.

8° Réaction au rouge de phénol (133).

C'est un indicateur de pH qui permet la mise en évidence des acides étiéniques par modification de coloration.

15 BAULIEU E.-E., WEINMANN S. H. et JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 12, 1371-1393.

Réactifs.

a) Solution éthanolique de rouge de phénol :

— rouge de phénol	50 mg
— Alcool à 95°	50 ml

b) Solution aqueuse de tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane :

— T. H. A. M.	610 mg
— eau distillée	50 ml

Au moment de l'emploi, on fait le mélange suivant :

— Alcool méthylique absolu ..	9 ml
— Solution <i>a</i>	1 ml
— Solution <i>b</i>	0,5 ml

On fait virer la coloration du mélange au rouge franc par addition d'une ou deux gouttes de Na OH 0,1 N.

On pulvérise le chromatogramme avec le mélange ci-dessus, la présence d'une substance à fonction acide se traduit par une modification de la coloration (vire au jaune).

Remarque.

Seuls les chromatogrammes développés par le système de solvant du type Bush sont utilisés ici.

9° *Réaction au pourpre de bromocrésol.*

Le principe est le même que celui de la précédente réaction.

Réactifs.

a) Solution méthanolique au pourpre de bromocrésol à 0,04 p. 100 (p : v).

b) Solution aqueuse du borax à 1 p. 100 (p : v).

c) Solution composée de :

— acide borique en paillettes ..	100 mg
— solution <i>a</i>	100 ml
— solution <i>b</i>	7,5 ml

La pulvérisation des chromatogrammes est faite avec la solution c.

La présence des stéroïdes acides se traduit par l'apparition d'une coloration jaune.

Remarques.

Comme précédemment, seul le chromatogramme développé par le système de solvant du type Bush est utilisé.

La solution c peut être conservée pendant 2-3 mois.

En résumé, l'analyse qualitative de nos extraits comporte :

A. — *Une séparation des stéroïdes :*

Cette séparation est réalisée par l'emploi de la chromatographie descendante sur papier à l'aide de deux systèmes de solvants.

1° Système du type Zaffaroni : chloroforme-formamide.

2° Système du type Bush : chloroforme + méthanol + ammoniac N (1 : 1 : 1).

B. — *Une identification des stéroïdes sur le chromatogramme par 4 groupes de réactions :*

1° L'identification du groupement insaturé du noyau A emploie deux réactions :

- absorption ultra-violette à 255 m μ ;
- réaction à l'I. N. H.

2° La caractérisation de la chaîne latérale utilise 3 réactions de principes différents :

- réaction au bleu de tétrazolium ;
- réaction à la pentanedione ;
- réaction à la benzidine.

3° L'identification des 17-cétostéroïdes a recours à la réaction de Zimmermann.

4° La recherche des acides étiéniques est basée sur le virage de deux colorants indicateurs de pH :

- réaction au rouge de phénol ;
- réaction au pourpre de bromocrésol.

CHAPITRE XII

ASPECTS QUALITATIFS DE LA CONSERVATION

Le contrôle chromatographique de chacun des extraits devrait permettre :

— de confirmer les résultats du dosage qui ont montré la dégradation de la chaîne latérale ;

— de mettre en évidence le, ou les produits formés ;

— d'en préciser la nature chimique en s'appuyant sur les critères chromatographiques et les réactions de révélation.

C'est dans ce dessein, qu'après avoir évalué la teneur en stéroïde d'un extrait alcoolique, celui-ci a été régulièrement soumis à l'examen chromatographique : aussi un même échantillon conserve-t-il la même appellation pour les deux contrôles.

A. — Résultats de l'analyse chromatographique.

La chromatographie, dans les deux systèmes décrits précédemment, était réalisée dans les jours suivant l'extraction. Mais, dans le court délai séparant les deux opérations, les extraits ainsi que les solutions témoins des stéroïdes étaient conservés en récipients hermétiquement bouchés à la température de + 4° C.

Avant d'étudier la localisation et la nature des produits formés, on doit insister sur deux faits :

1° Pour un même mélange et une même température de conservation, les spots de produits dégradés sont toujours identiques, seule leur surface et leur intensité aux différentes réac-

tions de révélation vont croissant ; il ne semble pas, par conséquent, exister de formes de dégradation transitoires.

2° Le nombre des produits de dégradation issus d'un même stéroïde dépend du mélange étudié. Toutefois, les spots retrouvés présentent des R_{F} et des réactions d'identité communs.

Il est matériellement impossible de faire figurer dans cet exposé les résultats des centaines de chromatogrammes réalisés tout au long de ce contrôle.

Il fallait faire un choix : seuls sont réunis les résultats qui concernent les contrôles réalisés aux 16^e et 18^e mois sur les mélanges conservés à l'étuve à 50° C, conditions auxquelles la dégradation nous avait apparue quantitativement la plus importante.

Schéma de la position des spots

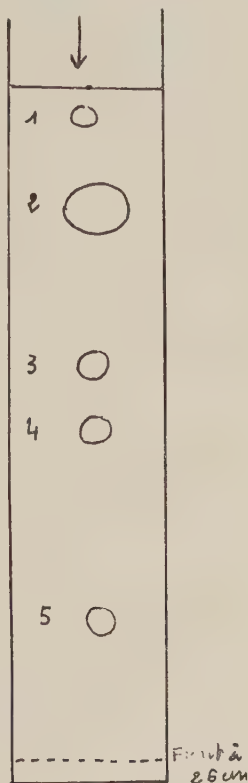


TABLEAU VII

- Chromalog des extraits d'Hydrocortisone
- Contrôle au 16^e et 18^e mois. Température : 50° C.
- Système : Chloroforme-Formamide (Zaffaroni)
 - durée de saturation : 1 h 30,
 - durée de résolution : 2 heures.

		Spots révélés par l'issud à UV 255 mμ				
		1	2	3	4	5
R _F		0.03	0.18	0.40	0.50	0.72
Hydrocortisone			+			
Extrait I		+	+	+	+	+
II		+	+		+	
III		±	+			
IV		+	+	±	+	
V		+	+	+	+	
Réactions de révélation						
UV		+	+	+	+	+
I.N.H		±	+	±	±	±
PO ₄ H ₃ à 15%		+	+	+	±	±
Bleu de Tétrazolium		±	+	—	—	—
Réaction à la pentanedione		—	+	—	—	—
Réaction à la benzidine		—	+	—	—	—
Réaction Zimmermann		—	±	—	—	—
Rouge phénol		—	±	—	—	—
Pourpre bromocrésol		—	±	—	—	—

±: Fl. jaune

± Fl. jaune. faible.

± Réaction positive retardée

± col. bleue (3 citone).

± vert. jaunâtre

± Fl. rouge-orangé à 365 mμ.

TABLEAU VIII

- Chromatographie des extraits d'Hydrocortisone
- Contrôle au 16^e et 18^e mois .
- Système : Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque (Bush)
- durée de saturation : 4 heures,
- durée de résolution : 2 heures.

		spots révélés par UV à 255 mμ		
		1	2	3
RF		0.04	0.10	0.88
Hydrocortisone témoin				+
Extrait: I		+	+	+
- II		+	+	+
- III		±		+
- IV		+	+	+
- V		+	+	+
Reactions de révélation				
UV		+	+	+
INH		+	+	+
PO ₄ H ₃ à 15%		+	+	+
Bleu de Tétrazolum		-	-	+
Réaction à la pentanedione		-	-	+
Réaction à la benzidine		+	-	+
Réaction de Zimmermann		-	-	±
Rouge de Phenol		-	-	±
Rouge de bromocrésol		-	-	±

+ col. bleue
(3 cétones)

± vert pâle

+ fl. rouge-orangé
à 365 mμ.

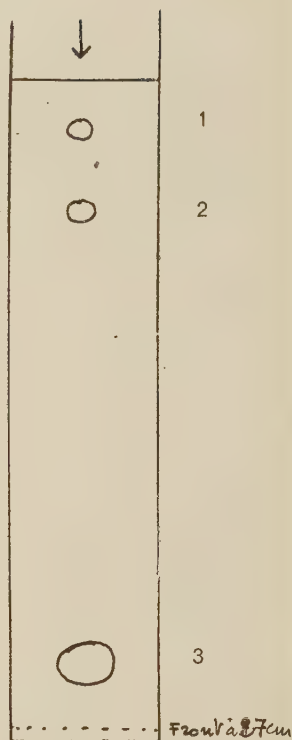
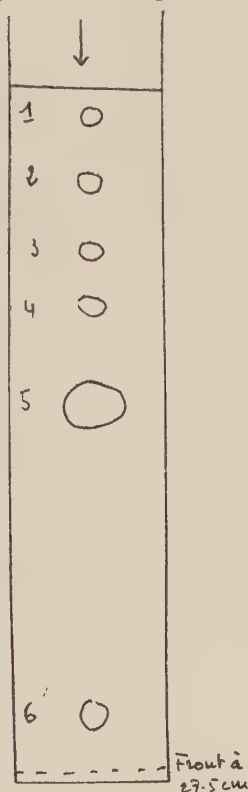


schéma de la position des
spots.

TABLEAU IX

- Chromatographie des extraits de Prédnisone.
- Contrôle au 16^e et 18^e mois. Température : 50° C.
- Système : Chloroforme-Formamide (Zaffaroni).
 - durée de saturation : 1 h 30,
 - durée de résolution : 2 heures.

Schéma de la position des spots



		Spots révélés par UV à 255 mμ					
		1	2	3	4	5	6
RF		0.02	0.10	0.16	0.26	0.43	0.86
Prédnisone						+	
Témoin							
Extrait Ibis		+		+	+	+	+
IIbis		+		+	+	+	+
IIIbis		+	±			+	
IVbis		+		+	+	+	+
Vbis		+		+	+	+	+
Réactions de révélation							
UV		+	+	+	+	+	+
INH		+	+	+	+	+	+
PbO_4H_2 à 15%		±	±	±	+	+	±
Bleu le tétrazolum		±	-	-	±	+	±
Réaction à la pentanedione		-	-	-	-	+	-
Réaction à la benzidine		-	-	-	-	+	-
Réaction de Zimmermann		-	-	-	-	±	-
Rouge de phénol		-	-	-	-	±	-
Lampre de Bromocré- -ol		-	-	-	-	±	-

± Fl. faible.

± col. retardée

± Bleu gris.
(3e tube).

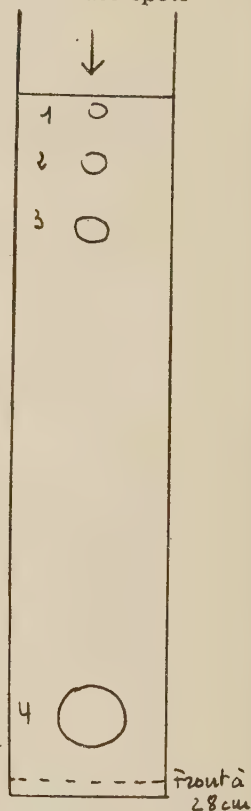
vert. jaunâtre

± Fl. rouge-orange
à 365 mμ.

Schéma de la position des spots

TABEAU X

- Chromatographie des extraits de Prédnisone.
- Contrôle au 16^e et 18^e mois. Température : 50° C.
- Système : Chloroforme-Méthanol-Ammoniaque (Bush)
- durée de saturation : 4 heures,
- durée de résolution : 2 heures.



	spots révélés par UV à 255 mμ			
	1	2	3	4
R _F	0.04	0.10	0.19	0.91
Prédnisone témoin				+
Extrait I _{Pris}		+	+	+
II _{Pris}			+	+
III _{Pris}	+			+
IV _{Pris}	+	+	+	+
V _{Pris}		+	+	+
Réaction de révélation				
UV	+	+	+	+
I.N.H	+	+	+	+
204 H ₃	±	±	±	+
B.T	±	±	-	+
Réaction à la pentanedione	-	-	-	+
Réaction à la benzidine	-	-	-	+
Réaction de Zimmermann	-	-	-	±
Rouge de phénol	-	-	-	±
Bougie de bromocrésol	-	-	-	±

± R_F faible,

± col. retardée

bleu-gris (3 citrons)

± vert-jaunâtre

± fl. rouge-brunâtre
à 365 mμ

ESSAIS D'INTERPRETATION CONCERNANT LES EXTRAITS ALCOOLIQUES D'HYDROCORTISONE.

Les deux systèmes chromatographiques ouvrent, par leur emploi parallèle, des possibilités à la recherche séparative. Par exemple, il est possible de mettre en évidence jusqu'à 5 spots avec le système chloroforme-formamide, tandis que le système chloroforme-méthanol-ammoniaque ne donne que 3 spots dont 2 sont identifiables à des produits de dégradation.

Le nombre des spots varie suivant les mélanges.

Pour une même substance, le R_f des spots est différent selon le système chromatographique. Nous précisons que le spot n° 2 du système chloroforme-formamide et le spot n° 3 du système chloroforme-méthanol-ammoniaque représentent l'hydrocortisone non dégradée (R_f 0,18 dans le premier, 0,88 dans le second).

1° Système chloroforme-formamide (tableau VII).

Dans le mélange III, on ne peut caractériser qu'un seul spot anormal, d'ailleurs à l'état de trace de R_f 0,03. Par contre, tous les autres mélanges présentent en plus du spot de l'hydrocortisone, de 2 à 4 taches.

L'interprétation des résultats des réactions d'identification, tableau VII, conduit aux constatations suivantes.

a) La structure α , β insaturée du noyau A est conservée, puisque les fluorescences en U. V. et à l'I. N. H. sont toutes deux positives : l'absence de coloration à l'I. N. H., pour certains spots, est due aux faibles quantités de substances.

b) La fluorescence avec l'acide phosphorique présente une teinte similaire à celle de l'hydrocortisone.

c) Le pouvoir réducteur de la chaîne latérale α -cétole mis en évidence à l'aide du bleu de tétrazolium n'est manifeste que pour l'hydrocortisone non dégradée ; le spot n° 1 présente une réaction retardée, les autres spots ne fournissent pas de réaction. Les réactions à la pentanedione et à la benzidine confirment les résultats obtenus avec le bleu de tétrazolium. L'absence de réaction positive au bleu de tétrazolium ne peut être liée à une réduction de la fonction cétone en 20 en alcool, puisque par oxydation périodique, la chaîne latérale 17, 20, 21 -

triol donne naissance également à du formaldéhyde et que ce corps n'a pu être mis en évidence par la réaction à la pentanedione.

d) La dégradation n'entraîne pas une rupture au niveau de la liaison 17,20 puisque les divers spots ne donnent pas la réaction de Zimmermann.

e) Les réactions aux indicateurs de pH (pourpre de bromocrésol, et rouge de phénol), ne fournissent pas de résultats valables. On peut trouver à cela plusieurs raisons, la quantité relativement faible des produits, ou la persistance sur les chromatogrammes de solvants constituant la phase stationnaire dont l'élimination est toujours incomplète.

2° Système chloroforme-méthanol-ammoniaque (tableau VIII).

a) Ce système, proposé pour la révélation des acides étiéniques, révèle la présence de deux produits secondaires de Rf très différents de celui de l'hydrocortisone présente dans les mélanges I, II, IV et V ; seul le mélange III ne contient que le produit de Rf 0,04 et seulement à l'état de trace.

b) Les fluorescences en U. V. et à l'I. N. H. sont positives pour les deux spots, alors que les réactions de mise en évidence du groupe α -céto sont négatives.

ESSAIS D'INTERPRETATION CONCERNANT LES EXTRAITS ALCOOLIQUES DE PREDNISONE.

La même constatation peut être faite au sujet du pouvoir séparateur des deux systèmes, en plus du spot de la prédnisone (Rf 0,43 dans le système chloroforme-formamide, et 0,91 dans le système chloroforme-méthanol-ammoniaque), 5 produits nouveaux apparaissent sur les chromatogrammes du premier système et 3 seulement sur ceux du deuxième système.

Le nombre des spots varie ici aussi suivant les mélanges.

La prédnisone, non dégradée, correspond au spot n° 5 dans le premier système et n° 4 dans le second.

1° Système chloroforme-formamide (tableau IX).

Pour les mélanges I bis, II bis, IV bis et V bis, la chromatographie sur papier assure la séparation de 5 et 6 spots ; le

mélange III bis montre en U. V. 2 taches, l'une caractéristique de Rf 0,02, l'autre d'intensité très faible de Rf 0,10 .

a) Les fluorescences en U. V. à 255 m μ et après pulvérisation à l'I. N. H. sont positives pour tous les spots : la structure insaturée du noyau A paraît conservée ; cependant, il faut noter l'absence de modifications de la fluorescence sous irradiation à 255 m μ pour le spots 2 et 3 ; pour toutes les autres taches, la fluorescence passe au bleu clair après 30 secondes à 1 minute d'irradiation.

b) La fluorescence jaune-vert de la prédnisone obtenue après pulvérisation de l'acide phosphorique à 15 % est conservée pour tous les spots ; les transformations de structure des produits de dégradation formés n'entraînent donc pas de modifications de la réactivité des stéroïdes vis-à-vis de l'acide phosphorique.

c) L'intensité et surtout la vitesse d'apparition des formazanes obtenues par réduction du bleu de tétrazolium sont très différentes d'un spot à l'autre ; seul le spot 2 réagit aussi intensément que la prédnisone ; pour les autres : 1,4 et 5, la coloration violette est lente à apparaître, et le spot 3 ne réagit pas avec le bleu de tétrazolium.

Les réactions à la pentanedione et à la benzidine ne sont positives que pour la tache de prédnisone.

d) La réaction de Zimmermann est constamment négative, seul le spot de prédnisone donne une coloration gris-bleu (3 cétone).

e) Enfin, la mise en évidence des acides étiéniques par pulvérisation avec les solutions d'indicateurs de pH (rouge de phénol et pourpre de bromocrésol) est difficile à interpréter.

2° Système chloroforme-méthanol-ammoniaque (tableau X).

Trois spots différents de celui de la prédnisone sont mis en évidence sur les chromatogrammes par l'examen en lumière ultra-violette à 255 m μ . Les corps 2 et 3 se retrouvent dans les mélanges I bis, IV bis et V bis. Le mélange III bis est caractérisé par la présence d'un seul spot anormal de Rf très faible (0,04). La dégradation apparaît pour ce mélange nettement réduite. Les produits séparés possèdent la structure insaturée

du noyau A (U. V. et I. N. H.), mais présentent une réactivité faible au bleu de tétrazolium.

*
**

1° La dégradation apparaît complexe, chaque stéroïde peut donner en effet naissance à plusieurs produits de dégradation.

2° Les spots présentant le même Rf et la même réactivité se forment dans plusieurs mélanges : on peut donc supposer que la dégradation suit le même processus.

3° La plus grande fragilité de la prédnisone mise en évidence lors des contrôles quantitatifs est confirmée par l'étude chromatographique, les spots formés sont plus nombreux et quantitativement plus importants.

4° Le mélange n° 3 assure la meilleure conservation de l'hydrocortisone et de la prédnisone, comme indique le petit nombre de produits secondaires apparus.

5° Tous les produits formés conservent une structure insaturée du noyau A, puisque la fluorescence en U. V. à 255 m μ et la réaction à l'I. N. H. sont toujours positives. Par contre, la persistance de la structure α -cétolique de la chaîne latérale est moins certaine. La plupart des produits formés fournissent une réaction positive au bleu de tétrazolium, mais celle-ci possède une cinétique retardée. Or, comme on l'a vu (120), la réduction du bleu de tétrazolium ne peut être considérée comme spécifique du groupement α -cétol que si la vitesse de la réaction est rapide. D'autres groupements de la molécule sont susceptibles de réagir plus lentement avec ce réactif.

L'absence de réaction positive avec la pentanedione ou la benzidine suggère également l'atteinte de la chaîne latérale, sans que celle-ci soit totale, puisque la réaction de Zimmermann, en ce qu'elle caractérise le groupement CO en 17, reste constamment négative.

La sensibilité des réactions aux indicateurs de pH est insuffisante pour permettre une interprétation valable.

Ces résultats confirment la grande fragilité de la chaîne latérale opposée à la stabilité du noyau A. La chromatographie et l'analyse quantitative conduisent donc aux mêmes conclusions.

B. — Essais d'identification des corps formés.

L'analyse chromatographique a mis en évidence, dans les poudres conservées longtemps à 50° C, plusieurs produits de dégradation de stéroïdes qui ne possèdent plus les propriétés réductrices du groupement α -céto : l'ensemble des données expérimentales permet de supposer l'existence d'un groupement carboxylique en 20.

Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes proposé de vérifier cette hypothèse en réalisant successivement :

I. — La préparation des acides étiéniques correspondant respectivement à l'hydrocortisone et à la prédnisone, les substances témoins n'existant pas sur le marché.

II. — L'extraction sélective des produits de dégradation de nature acide présents dans les extraits alcooliques.

III. — La comparaison des critères analytiques des acides étiéniques témoins et des produits de dégradation isolés.

I. — Préparation des acides stéroïdes à partir de l'hydrocortisone et de la prédnisone.

Cette préparation fait appel à l'oxydation périodique de la chaîne latérale α -céto des stéroïdes (134).

a) Oxydation.

Dans une fiole d'erlenmeyer de 100 ml on introduit les produits suivants :

Corticostéroïde	5,0 mg
Alcool méthylique absolu	15,0 ml
Solution aqueuse saturée de périodate K	2,5 ml
Acide sulfurique concentré	2,0 ml

La fiole, non bouchée, est agitée fortement toutes les 5 minutes pendant une heure.

b) Extraction des acides stéroïdes formés.

Dans une ampoule à décantation on introduit :

- le contenu de l'erlenmeyer ;
- l'eau de rinçage de l'erlenmeyer (10 ml $\times$ 2).

134 PAN S.C. — *J. of. Chromatography*, 1962, 9, 81-91.

L'extraction est réalisée de l'éther éthylique (10 ml×3) qui dissout une importante fraction du stéroïde en excès et la totalité des acides formés.

Aux extraits étherés décantés et réunis, on ajoute 5 ml de soude 0,1 N ; on agite pendant 10 minutes, on soutire après décantation la phase aqueuse qui contient les acides étiéniques sous forme de sel de sodium ; les stéroïdes non transformés restent dans l'éther. La phase aqueuse est ensuite acidifiée par H_2SO_4 0,1 N jusqu'à pH 1. Les acides étiéniques régénérés sont réextraits par l'éther éthylique (10 ml×3). Les phases étherées décantées et réunies sont lavées avec de l'eau distillée (5 ml×2), puis séchées sur du sulfate de sodium anhydre.

Cette succession des temps d'extraction permet d'éliminer la totalité des stéroïdes non oxydés ainsi que le confirme l'analyse chromatographique des extraits étherés.

Les solutions des acides stéroïdes témoins sont appelées :

T₁ : le produit d'oxydation de l'hydrocortisone ;

T₂ : le produit de l'oxydation de la prédnisone.

II. — *Extraction sélective des produits de dégradation à partir des extraits alcooliques des poudres à comprimer.*

Seuls les extraits alcooliques des mélanges conservés jusqu'aux 18^e et 20^e mois à l'étuve à 50° C ont été étudiés.

Dans une ampoule à décantation, on introduit :

Extrait alcoolique 10 ml

Eau distillée 20 ml

Après avoir mélangé, on procède à l'extraction par l'éther éthylique, en respectant les différents temps décrits dans le paragraphe précédent.

III. — *Essai d'identification des produits d'oxydation.*

L'identification a été tentée par confrontation de critères analytiques et du comportement chromatographique des acides étiéniques témoins et des produits de dégradation isolés.

A. — *Critères analytiques.*

1° *Fluorescence en milieu sulfurique.*

Une partie aliquote des extraits étherés est évaporée, le résidu est repris par l'acide sulfurique concentré R. P. (d : 1,83).

L'acide étiénique témoin (T₁) correspondant à l'hydrocortisone et les produits isolés à partir des extraits alcooliques provenant eux-mêmes des mélanges contenant de l'hydrocortisone, développent la même fluorescence verte. Cette fluorescence est donnée également par l'hydrocortisone.

L'acide étiénique témoin (T₂) correspondant à la prédnisone et les produits isolés des extraits alcooliques de prédnisone donnent la même fluorescence jaune-vert ; celle-ci est également donnée par la prédnisone.

2° Les solutions concentrées, qu'elles correspondent aux témoins ou aux produits de dégradation, déposés sur le papier Whatman n° 1 présentent les caractères suivants :

a) Fluorescence violet sombre sous l'excitation des rayons ultra-violet de longueur d'onde de 255 m μ , virant au bleu clair uniquement dans le cas des dérivés correspondant à la prédnisone.

b) Coloration jaune visible à l'œil nu et fluorescence jaune en lumière de Wood à 365 m μ avec le réactif à l'I. N. H. ; cette coloration jaune apparaît plus rapidement dans le cas des dérivés de l'hydrocortisone que dans celui des dérivés de la prédnisone.

c) Réaction négative avec le bleu de tétrazolium, seul le contour des taches est caractérisé par la présence d'un liseré bleu qui apparaît 5 minutes environ après la pulvérisation.

d) Coloration jaune par pulvérisation des réactifs indicateurs de pH (rouge de phénol et pourpre de bromocrésol).

B. — *Critères chromatographiques.*

Un dernier caractère d'identité entre les acides stéroïdes témoins et les produits dégradés de nos mélanges est donné par le R_f dans deux systèmes de solvants :

— chloroforme-formamide ;

— chloroforme-méthanol-ammoniaque.

Dans les deux systèmes de solvants, on obtient 2 spots pour toutes les solutions étherées (dans le premier système le spot n° 2 est très peu visible pour l'hydrocortisone).

TABLEAU XI

Rf des acides étiéniques et des produits de dégradation isolés

Système chloroforme-formamide					
Rf	Spots	T ₁	Extraits provenant d'Hydrocortisone conservée	T ₂	Extraits provenant de Prédnisone conservée
	1	0,04	0,04	0,07	0,07
	2			0,25	0,25
Système BUSH modifié					
Rf	Spots	T ₁	Extraits provenant d'Hydrocortisone conservée	T ₂	Extraits provenant de Prédnisone conservée
	1	0,04	0,04	0,09	0,09
	2	0,10	0,10	0,16	0,16

Les produits de dégradation isolés des extraits alcooliques présentent des Rf identiques à ceux des produits d'oxydation périodique de l'hydrocortisone et de la prédnisone.

Tous les spots isolés sont mis en évidence par leur fluorescence en U. V. à 255 mμ et leur réaction positive à l'I. N. H. La réduction du bleu de tétrazolium est par contre négative.

Les Rf retrouvés ici correspondent à ceux des produits identifiés lors de l'analyse chromatographique directe des extraits alcooliques.

La formation d'acides étiéniques par oxydation de la chaîne latérale α-cétolique 20,21, de l'hydrocortisone et de la prédnisone dans nos mélanges pour comprimés paraît constituer un des mécanismes de dégradation des stéroïdes, mais il demeure évident que ce processus de dégradation est limité. Il nous est impossible de préciser dans le détail la structure des produits formés.

CHAPITRE XIII

RESUME ET COMMENTAIRES DES RESULTATS

Depuis la découverte de HENCH, les emplois thérapeutiques de la cortisone et des corticoïdes de synthèse se sont généralisés ; leur présentation sous forme pharmaceutique s'est considérablement diversifiée. Cependant, la forme « comprimé » reste la plus utilisée, et si elle n'a pas encore fait l'objet de monographies dans la Pro Pharmacopoea, il est à penser que celles-ci vont prendre place dans la prochaine pharmacopée française. Déjà les pharmacopées de langue anglaise ont consacré un certain nombre d'études à des comprimés de stéroïdes naturels et de synthèse.

Notre travail a pour objet de rassembler les données actuelles sur le contrôle des stéroïdes dans les formes pharmaceutiques et d'étudier spécialement les méthodes d'identification, de dosage et surtout de suivre la conservation de deux stéroïdes, l'un naturel, l'hydrocortisone, l'autre synthétique, la prédnisone dans différents mélanges solides destinés à la compression.

La stabilité de la molécule stéroïde en milieu liquide a été étudiée par de nombreux chercheurs (chapitre V) ; les travaux réalisés fournissent des preuves de la fragilité de deux groupements réactifs de la molécule : chaîne latérale 17,21-diol 20-one et groupement insaturé du noyau A.

La conservation des stéroïdes dans les mélanges de poudres destinées à la granulation ou dans les comprimés n'a pas, à notre connaissance, fait l'objet de recherches publiées. On peut toutefois supposer que la conservation des stéroïdes en milieu solide est supérieure à celle constatée en milieu liquide ; en effet, les excipients pour comprimés sont en général des poudres inertes sans influence prévisible sur la conservation des hormones stéroïdes.

Dans notre étude, l'hydrocortisone et la prédnisone sont chacune réparties dans 5 formules de compositions différentes. Les uns ont pour base des excipients minéraux, les autres des excipients organiques. Bien que le milieu de conservation soit en principe anhydre, nous avons voulu voir si un milieu à réaction alcaline ou acide modifierait la molécule stéroïde, c'est ainsi qu'une formule est rendue alcaline par l'emploi de la magnésie calcinée comme diluant, une autre acide par l'emploi de l'acide citrique.

Les mélanges conservés à trois températures différentes (température du laboratoire, 37° C et 50° C) sont soumis à l'analyse mensuellement. Le titre de chaque mélange en stéroïdes est évalué à la fois par la réaction de Porter et Silber, par l'absorption en U. V. et la réaction à l'I. N. H. ; le contrôle qualitatif est effectué après séparation chromatographique sur papier.

I. — Méthodes de contrôle.

1° *Extraction.*

Les méthodes d'extraction des stéroïdes des formes médicamenteuses ne semblent pas avoir fait l'objet de publications, mais on les trouve dans les ouvrages officiels : Pharmacopées américaine, anglaise et internationale.

L'emploi de l'alcool absolu pour extraire l'hydrocortisone et la prédnisone de nos mélanges donne de bons résultats, sauf dans le cas des mélanges de formule n° 2 qui contient du lactose et du saccharose (ce dernier est partiellement soluble dans l'alcool absolu) ; le fructose, qui possède un groupement α -cétolique, intervient dans la réaction de Porter et Silber. Un inconvénient analogue apparaît avec le lactose lorsque le dosage des stéroïdes est réalisé par la réaction au bleu de tétrazolium.

La mise en suspension aqueuse de la poudre suivie d'une extraction chloroformique est dans ce cas nécessaire. Aussi avons-nous été contraints d'utiliser des solvants différents pour extraire le stéroïde des mélanges solides.

2° *Les réactions utilisées pour le dosage.*

Pour le dosage des corticostéroïdes dans les médicaments, les contrôles officiels ou les travaux expérimentaux font appel le

plus souvent à la réduction des sels de tétrazolium ; or celle-ci, positive avec toutes les chaînes latérales α -cétoïques, n'est spécifique de ce groupement que dans des conditions expérimentales bien déterminées. La réaction de Porter et Silber, dont l'emploi s'est généralisé en biochimie, présente une spécificité vis-à-vis de la chaîne latérale 17,21-dihydroxy 20-one, spécificité d'autant plus marquée quand elle est pratiquée en milieu peu contaminé. C'est cette raison qui nous fait choisir la réaction de Porter et Silber pour juger le comportement de la chaîne latérale au cours de la conservation des mélanges. En chromatographie, par contre, la réaction au bleu de tétrazolium présente de nombreux avantages.

Mais l'évaluation de la chaîne latérale, insuffisante à elle seule, est complétée par l'évaluation du groupement insaturé du noyau A, au moyen de deux réactions spécifiques : l'une physique, mesure l'absorption de la lumière ultra-violette par le système α , β insaturé du noyau A ; l'autre chimique, la réaction à l'I. N. H. transforme le groupement 3-one en iso-nicotinyl hydrazone de coloration jaune. C'est en raison de leur fondement très différent que ces deux méthodes ont été retenues.

II. — Etude de la conservation.

L'évaluation quantitative des stéroïdes et leur séparation chromatographique conduisent à des résultats qui permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

- 1) La dégradation n'affecte que la chaîne latérale.
- 2) L'altération est plus importante pour la prédnisone que pour l'hydrocortisone.
- 3) Le facteur température influe sur l'oxydation de la chaîne latérale.

1° *La dégradation n'affecte que la chaîne latérale.*

Les réactions de dosage du groupement α , β insaturé du noyau A ont permis de retrouver le taux initial de stéroïde tout au long des 22 mois de conservation. Par contre, la réaction de Porter et Silber met en évidence la destruction progressive de la chaîne latérale.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse chromatographique : plusieurs stéroïdes ainsi séparés peuvent être révélés

par l'examen en U. V. à 255 m μ et la réaction à l'I. N. H., tandis que la réaction au bleu de tétrazolium est négative ou douteuse.

L'altération de la chaîne latérale ne nous surprend pas, puisque la dégradation de ce groupement a été mise en évidence en milieu liquide par plusieurs auteurs (chapitre V).

2° *L'altération est plus importante pour la prédnisone que pour l'hydrocortisone.*

Dans les mêmes mélanges et dans les mêmes conditions de conservation, la dégradation est régulièrement plus importante pour la prédnisone que pour l'hydrocortisone. C'est à une conclusion analogue qu'avaient aboutis les travaux réalisés en milieu liquide par plusieurs chercheurs français (chapitre V). La présence simultanée d'une double liaison supplémentaire en 1-2 et d'une cétone sur le carbone 11 favorise l'oxydation de la chaîne latérale 17,21-diol 20-one : la plus grande fragilité de la prédnisone se trouve ainsi justifiée.

3° *Influence de la température.*

L'action de la température est importante à noter. Le noyau A paraît insensible à son action. La chaîne latérale, au contraire, subit une dégradation croissante avec l'augmentation de la température. Mais l'intervention de ce facteur physique apparaît plus nettement sur l'induction de la dégradation que sur sa vitesse proprement dite, puisque les courbes traduisant les pourcentages de perte de stéroïde aux différentes températures de conservation restent parallèles. Ce dernier point est encore en accord avec les résultats obtenus en milieu liquide, VELLUZ et coll. (175) ont en effet montré que la vitesse d'oxydation de la chaîne latérale n'augmente pas parallèlement avec la température.

4° *Influence des excipients.*

L'influence des excipients est certainement primordiale dans la conservation de l'hydrocortisone et de la prédnisone. La présence dans les mélanges de substances à réaction alcaline ou

175 VELLUZ L., PETIT A., PESEZ M. et BARRET R. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1947, fasc. 1-2.

acide ne semble pas influencer la dégradation des stéroïdes. Cette constatation est en opposition avec les données expérimentales obtenues en milieu liquide.

L'altération de la chaîne latérale semble être liée à un processus d'auto-oxydation favorisé par les catalyseurs métalliques apportés par les excipients. La présence dans les mélanges d'« antioxydants indirects », tels que le lactose et surtout l'acide citrique ralentit ou inhibe totalement la dégradation de la chaîne latérale.

III. — A quel mécanisme peut-on attribuer la dégradation de la chaîne latérale 17,21 - Diol 20 - one ?

On pourrait supposer que la transformation de la chaîne latérale puisse se réaliser au moins de trois façons (chapitre V).

1° *Réduction de la fonction cétone en 20 en fonction alcoolique.*

La possibilité d'une réduction de la fonction cétone en 20 est à éliminer, en raison de réactions négatives obtenues avec les réactifs à la pentanedione et à la benzidine.

2° *Rupture de la chaîne latérale et formation de 17-cétostéroïdes.*

La rupture oxydative de la chaîne latérale avec formation de 17-cétostéroïdes ne peut également être retenue, puisqu'il n'a jamais été possible de caractériser une fonction cétone en 17 par la réaction de Zimmermann.

3° *Oxydation avec formation d'acides étiéniques.*

La formation d'acides étiéniques par perte du carbone 21 et oxydation du carbone 20 paraît probable : les produits de dégradation de nos mélanges semblent identiques, par les critères chimiques et chromatographiques, aux produits d'oxydation périodique de l'hydrocortisone et de la prédnisone, qui sont des acides étiéniques. Mais on ne peut affirmer que ce mécanisme soit le seul à intervenir dans la destruction de la chaîne latérale des stéroïdes étudiés.

IV. — Dédutions pratiques.

1° L'ensemble des résultats exposés et discutés tout au long de ce travail montre que dans le contrôle des préparations de corticostéroïdes, il est indispensable :

a) d'appréhender simultanément deux séquences différentes de la molécule stéroïde ;

b) de vérifier par la chromatographie sur papier la nature des corps dosés, et de mettre en évidence la présence éventuelle des produits de dégradation.

2° L'action protectrice de l'acide citrique vis-à-vis de l'auto-oxydation de la chaîne latérale 17-21-diol 20-one peut servir de base à une étude systématique de l'influence d'agents séquestrants sur la conservation des stéroïdes en milieu solide.

CONCLUSIONS

I. — Le contrôle des corticoïdes dans les formes pharmaceutiques doit faire appel à *au moins deux méthodes de dosage évaluant des groupements différents de la molécule*.

II. — Au cours de la conservation à différentes températures de poudres destinées à la fabrication de comprimés, la structure insaturée du noyau A demeure inaltérée.

Par contre, qu'il s'agisse d'hydrocortisone ou de prédnisone, on constate une dégradation similaire qui se manifeste par une oxydation de la chaîne latérale 17-21-dihydroxy 20 cétone.

III. — Mais quantitativement, la dégradation de la prédnisone est plus importante que celle de l'hydrocortisone placée dans les mêmes conditions. On peut attribuer la plus grande fragilité de la prédnisone à la présence d'une double liaison supplémentaire en 1-2 et à l'existence en 11 d'une cétone à la place d'un hydroxyle secondaire.

IV. — Si les facteurs température et durée de conservation interviennent dans l'altération des corticostéroïdes en milieu solide et complexe, il semble que la *nature des excipients du mélange* en constitue le facteur principal : le pourcentage de dégradation enregistré au bout de 20 mois de conservation à la température ordinaire varie par exemple de 0 à 20 % environ, selon la composition du mélange.

V. — La présence dans l'excipient d'acide citrique protège manifestement la chaîne latérale 17,21-dihydroxy 20 cétonique de l'oxydation. On peut attribuer cette protection à l'action « anti-oxydante indirecte » que l'acide citrique manifeste par son rôle d'agent séquestrant.

VI. — L'analyse chromatographique des mélanges nous a permis de confirmer les résultats des contrôles quantitatifs. Les produits de dégradation ont été séparés sous forme de spots, qui pourraient être identifiés : par comparaison avec des produits de l'oxydation périodique de corticostéroïdes, nous confirmons l'existence d'acides étiéniques parmi les stéroïdes de dégradation.

VU, LE DOYEN :

J.-F. CIER.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

L. REVOL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER,

Lyon, le 25 janvier 1965

LE RECTEUR,

PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ :

P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ABELSON D. et BONDY K. — *Arch. Biochem. et Biophys.*, 1955, 57, 208.
- 2 ALLEN W. S., PIDACKS C. C., SCHAMB C. R., EWEISS M. J. — *J. Org. Chem. U. S. A.*, 1961, 26, 5046-52.
- 3 ANSARI S., KHAN R. A. — *J. Pharm. and Pharmacol.*, 1960, 12, 122-125.
- 4 ALLEN G. J. R. and Nancy A. AUSTIN. — *J. Org. Chem. U. S. A.*, 1961, 26, 4574.
- 5 ANONYME. — *Chem. Eng. News*, 1959, 37, n° 5, p. 23.
- 6 ARENDS. — *Die Tablett in Fabrikation*, Springer Berlino, 1950.
- 7 ARTH G. E. et Coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 3161.
- 8 AXELROD L. R. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 6301.
- 9 AXELROD L. R. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 1308.
- 10 AXELROD L. R. and PULLIDER J. E. — *Anal. Chem.*, 1960, 32, 1200-1202.
- 11 BADINAND A., MALLEIN R., REVOL A., LECHEVIN J.-C. — Congrès Soc. Pharmacie, Toulouse, 1961.
- 12 BADINAND A. et REVOL A. — Conférence de la Société Techniques Pharmaceutiques, 1961.
- 13 BANES D.-J. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1950, 39, 37.
- 14 BANES D.-J. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1953, 42, 669.
- 15 BAULIEU E. E., WEINMANN S. H. et JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Dol.*, 1957, 12, 1371-1393.
- 16 BARBER M. et DELAUNAY A. — *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 1951, 18, 193.
- 17 BARBIER P. — *Sem. Hôp. Thérap.*, 1960, 8, 697.
- 18 BARTON and THAFIG. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 928.
- 19 BARTON and TAYLOR. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 244.
- 20 BARTON D. H. R. et TAYLOR W. C. — *J. Chem. Soc.*, 1958, 2500.
- 21 BARTOS J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, 17, 141.

- 22 BERSTEIN S., LENHARD R.H., ALLEN W.S., LIHELL R., STOLAR S.M.,
FELDMANN L.P. et BLANK R.H. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78,
5693.
- 23 BERSTEIN S. et LENHARD R.H. — *J. Org. Chem.*, 1953, 18, 1146.
- 24 BERSTEIN S. et LENHARD R.H. — *J. Org. Chem.*, 1954, 19, 1269.
- 25 BLOCK R.J. et BOLLING D. — *J. Biol. Chem.*, 1939, 129, 1.
- 26 BODANSKY A., KOLLONISTH. — *Nature*, 1961, 13, 61-63.
- 27 BOLAND. — *J. Am. Med. Assoc.*, 1956, 160.
- 28 BOON P.F.G. et Coll. — *J. Pharm. Pharmacol.*, 1961, 13, 62-65.
- 29 BOWERS A., IBANEZ L.C. et RINGOLD H.J. — *Tetrahedron*, 1959,
7, 138.
- 30 BOWERS A. and RINGOLD H.J. — *Tetrahedron*, 1958, 3, 14.
- 31 BOWERS A., DENOF E., BLANCA M., SANCHEZ et RINGOLD N.J. —
Tetrahedron, 1959, 7, 153.
- 32 BRITISH PHARMACOPOEA. — Monographies consacrées aux cortico-
stéroïdes (1963).
- 33 BROWN J.J. et BERSTEIN R.S. — *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 5033.
- 34' BUCHI. — *Schweizerische Apotheker Ztg*, 1960, 727, 98.
- 35 BURTON R.B., ZAFFARONI A. et KEUTMANN E. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 188,
763.
- 36 BUSH I.E., GALE M.M. — *Analyst*, 1958, 89, 532-36.
- 37 BUSH I.E. — *Biochem. J.*, 1952, 50, 370-378.
- 38 BUSH I.E. — *Federation Proc.*, 1953, 12, 186.
- 39 BUSH I.E. — *Recent Progress in Hormone Research*, Acad. Press.
(N-Y), 1954, IX, 21.
- 40 BUSH I.E. — *Ibid.*, 1954, IX, 21.
- 41 BUSH I.E. — *Biochem. J.*, 1955, 59, XV.
- 42 CASPI E., SCHMID W. et WITTRUCK T.A. — *Tetrahedron*, 1961, 16, 271.
- 43 CASPI E., SCHMID W. et B. Taqui KHAN. — *Tetrahedron*, 1962, 18,
767-775.
- 44 CAVINA G., CINGOLANI E. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, 246-258.
- 45 CHEDID L. — Hormones et infections. Thèse Sciences, Paris, 1955.
- 46 CHEN P.-S., WHERLER C.J. et TEWEELL H.E. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1953,
42, 749.
- 47 CHEN P.S. — *Anal. Chem.*, 1959, 31, 292-6.

- 47' CHULSKI T., FORIST A. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 553-5.
- 47" CHULSKI T., FORIST A. — *Ibidem*, page 533.
- 48 CINGOLANI E., GAUDIANO A. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1957, 12, 467-473.
- 49 CINGOLANI E. — *Il Farmaco* (Ed. Sci.), 1956, 11, 726-736.
- 50 CINGOLANI E., CAVINA G. et AMORMINO V. — *Il Farmaco* (Ed. prat.), 1960, 15, n° 5, 301-310.
- 51 CLARK P. — *Nature*, 1955, 175, 123.
- 52 COLLARD R. E. — *Pharm. J.*, 1961, 186, 113-117.
- 53 CONSDEN R., GORDON A. H. et MARTIN A. J. — *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.
- 54 COX R. I. — *J. Clin. Invest.*, 1957, 36, 1726.
- 55 CROSS, EISSEN et KEDERSHA R. G. — *Anal. Chem.*, 1952, 24, 1649.
- 55 CROSS, EISSEN et KEDERSHA R. G. — *Ibid.*, p. 1549.
- 57 DAVID E., GUTTMANN et PETERD MEISTER. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 773-8.
- 58 DELAROFF V. et SMOLIK R. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 142.
- 59 DELAROFF V., SMOLIK R., LEGRAND M. et MATHIEU J. — *Idem*, 1962, 1425-27.
- 60 DEPOOTER, CITATODA, DENOEL. — *Cours de Pharmacie pratique*. Liège, 1955.
- 61 DJERASSI C. et RYAN E. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1000.
- 62 DORFMAN L. — *Chem. Revs.*, 1953, 53, 47.
- 63 DOUHAIIRIE M. — *Pharmacie industrielle*, 1963, 65, p. 5.
- 64 DUTLER, BOSSHAND et JEGER. — *Helv. Chim. Acta*, 1957, 46, 494.
- 65 DUTLER, C. GANTER, M. REFF et Coll. — *Helv. Chim. Acta*, 1962, 45, 2346.
- 66 EKWALL P. T., LUDSTEN et L. SJOBLUM. — *Acta Chem. Scand.*, 1951, 5, 1383.
- 67 EISENBRAND et H. PICHER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, 260, 83.
- 68 EVANS L. K. et GILLAM A. Z. — *J. Chem. Soc.*, 1943, p. 565.
- 69 FABER. — *Arch. Pharm. Chem.*, 1947, 54, 591.
- 70 FEARON W. R. et BOGGUST W. A. — *Analyst*, 1954, 79, 101.
- 71 FEIGL F. et GOLDSTEIN D. — *Anais. Asso. Quimp.*, Brasil, 1952, 11, 133-134, C. A. 50, 15375 a.
- 72 FINKELSTEIN M. — *Nature*, 1952, 169, 929.

- 73 FLEURY P. — *Fiches Techniques de Chimie Biologique*, 1959, 6^e supplément, p. 1-6.
- 74 FRANC M. — Conférence à la Société Techniques Pharmaceutiques, Paris, 1962.
- 75 FRIED J.J. et E.H. SABO. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 2273.
Ibid., 1954, 76, 1455.
- 76 FRIED J.J., Z. HERG SABO, A. BORMAN, F.M. SINGER et P. NUMEND. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1068.
- 77 FRIED et A. BORMAN. — *Vitamines and Hormones*, 1958, 16, 303.
- 78 FRIGOT Pierre. — *Produits pharmaceutiques Fr.*, 1961, 16, 379-399.
- 79 FUKUSHIMA D. K., S. DOBRINER, M. S. HEFFER, T. H. KRITCHVESKY. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6585.
- 80 GARRET E. — *J. Pharm. Sci.*, 1962, 51, 445-50.
- 81 GEIGER R. S., J. A. DINGWALL et Coll. — *Am. J. of Med. Sci.*, 1956, 221, 427.
- 82 GIRAD A. et G. SANDULESCO. — *Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1095.
- 83 GOLDZICHER J. W., J. M. BODENCHUK et NOLAN. — *Anal. Chem.*, 1954, 26, 853.
- 84 GORDON J. J. et J. E. PELLY. — *Nature*, 1951, 168, 603.
- 85 GORNALL A. G., MAC DONALD M. P. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 201, 279-97.
- 86 GUTTMANN D. E. et Coll. — *J. Pharm. Sci.*, 1961, 50, 305-308.
- 87 GRAFF, MAC ELROY et MOONEY. — *J. Biol. Chem.*, 1952, 195, 351.
- 88 GREY et Coll. — *J. Am. Med. Assoc.*, 1951, 147, 1529.
- 89 HAMLIN W. E., T. CHULSKI, R. H. JOHNSON et WAGNER. — *J. A. P. A.*, 1960, 49, 2535.
- 90 HEARD R. D. H. et SOBEL H. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 165, 519.
- 91 HENCH P. S., KENDALL E., SLOCUNE C. H., POLLEY H. F. — *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin.*, 1949, 24, 181.
- 92 HELLER M., STOLAR S. H. et BERNSTEIN S. — *J. Org. Chem.*, 1962, 27, 328.
- 93 HENLY A. A. — *Nature*, 1952, 169, 877.
- 94 HERZIG P. P. et EHREISTEIN M. — *J. Org. Chem.*, 1951, 16, 1050.
- 95 HERZOG H. C., NOBILE A. et Coll. — *Science*, 1955, 121, 176.
- 96 HOFMANN H. et STAUDINGER H. — *Bioch. J.*, 1951, 322, 230.
- 97 HOGG A. F., LINCOHN H., JACKSON R. W et SCHNEIDER W. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6401.

- 98 HØYER G., SCAND. — *J. Clin. and Lab. Invest.*, 1951, 3, 303.
- 99 VAEDTKE Jacek, GAJEWSKA Anna et CZARNOLKA Anna. — *J. Chromato.*, 1963, 12, 208.
- 100 JAYLE M. F. — Analyse des stéroïdes hormonaux. Ed. Masson, Paris, 1961, t. II, p. 144.
- 101 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 139.
- 102 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 184.
- 103 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 188.
- 104 JAYLE M. F. — *Ibid.*, p. 185.
- 105 JENSEN J. B. — *Dansk. T. Farm.*, 1956, 30, 293-301.
- 106 KATSURA, MORITA, FUJIKOHARUTA. — *J. of Chromato.*, 1963, 12, 412.
- 107 KIRCHNER J. G., MILLER J. M. et KELLER G. J. — *Anal. Chem.*, 1951, 23, 420.
- 108 LAUBIE H. — *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1959, 98, 172.
- 108' LECHAT P. — Pharmacodynamie des stéroïdes. Journées Pharm. Fr., 1961.
- 108" LEDERER E. — *Chromatog. en Chim. Organique et Biologique*. Ed. Masson, Paris, 1959.
- 109 LEGRAND M., DELAROFF V. et MATHIEU J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1961, p. 1346.
- 110 LEW BART M. L. et MATTOX W. R. — *Anal. Chem.*, 1961, 33, 559.
- 110' LEW BART M. L. et MATTOX W. R. — *Nature*, 1959, 183, 820-21.
- 111 MADER W. J. et BUCK R. R. — *Anal. Chem.*, 1952, 24, 666.
- 112 MAISON H. C. — *Proc. Staff. Meetings Mayo Clinic.*, 1938, 13, 235.
- 113 MARCUS A. D. — *J. Am. Pharm. Assoc. (Sc. Ed.)*, 1960, 49, 383-5.
- 114 MARTIN A. J., SYNGE R. L. R. — *Biochem. J.*, 1941, 35, 91.
- 115 *Ibid.*, p. 1358.
- 116 MARVIN C., LEW BART M. L. et MATTOX W. R. — *Nature*, 1959, 183, 820-21.
- 117 MATHIEU J., LEGRAND M. et WALLIS J. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1960, p. 549.
- 118 MATTOX V. R., MASON H. L. et ALBERT A. — *Proc. Staff. Meeting Mayo Clin.*, 1953, 28, 569.
- 119 MENINI E. et NORYMBERSKI J. K. — *Biochem. J. London*, 1962, 84, n° 1, 195-201.

- 120 MEYER A.S., LINDBERG M.C. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 813-17.
- 121 MONDER C. et WHITE A. — *Endocrinology*, 1951, 68, 159-63.
- 122 MOON V.H., TERSHKOVEC. — *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, 1952, 79, 63.
- 123 MORRIS C.J. et WILLIAMS D.C. — *Biochem. J.*, 1953, 54, 470.
- 124 MUNZ et KAGIE. — *Pharm. Acta. Helv.*, 1954, 29, 53.
- 125 NEHER R. et WETTSTEIN A. — *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 2278-85.
- 126 NEHER R., cité par E. LEDERER. — *Chromatographie en Chim. Organique et Biologique*, Ed. Masson, Paris, 1959.
- 127 NELSON N. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 153, 375.
- 128 NELSON D.H. et SAMUELS L.T. — *J. Clin. Endocrinolog. et Metabolism*, 1952, 12, 529.
- 128' NOFFRE C. — Etude de la dégradation et de la stabilisation de l'ascorbique en solution aqueuse. *Thèse Pharmacie (Etat)*, Lyon, 1960.
- 129 NORZYMBERSKI J.K. — *Nature*, 1952, 170, 1074-75.
- 130 NOWACZYNSKI W., GOLDNER M., GENEST J. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 45, 818-821.
- 131 OLIVETO Z.P. et Coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 4431.
- 132 *Ibid.*, p. 4428.
- 133 PAN S.C., LASKIN A.P. et PRINCIPE P. — *J. of. Chromatography*, 1962, 8, n° 2, 32-36.
- 134 PAN S.C. — *J. of. Chromatography*, 1962, 9, 81-91.
- 135 PATHOLOGIE ET BIOLOGIE. — (*Sem. des Hôpitaux*) : *Archives de Biologie médicale*, n° 2, mars 1957.
- 136 PESEZ M., ROBIN J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, 17, 624-26.
- 137 PESEZ M. et BARTOS J. — *Talanta*, 1960, 5, 216.
- 138 PESEZ M. — *Lyon Pharmaceutique*, 1963, 8, 378-9.
- 139 PESEZ M., POIRIER P. — *Méthodes et réactions de l'analyse organique*, Ed. Masson, t. III, p. 227.
- 140 PESEZ M. et ROBIN J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 1930.
- 141 PESEZ M. et BARTOS J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1962, 20, 101.
- 142 PESEZ M., BARTOS J. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, p. 1928.
- 143 PORTER C.C., SILBER R.H. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 185, 201-7.
- 144 PRO PHARMACOPOEA. — *Notes techniques*, 26 et 27.

- 145 RAY W.H. and DEKAY H.G. — *J. A. P. A.* (Ed. prat.), 1953, 14, 430.
- 146 REVOL A., BURLET J. M., TISSOT A., PUTELAT R., BADINAND A., GUINET P. — *Rev. Lyon Med.*, 1959, 8, 949-968.
- 147 ROBSON H.N., DUTHIE J.J.R. — *Brit. Med. J.*, 1950, 2, 971.
- 148 ROBERT H.R. et Coll. — *J. Pharm. Sci.*, 1962, 58, 794-99.
- 149 RAMONOFF E.B., HUNT C.A. — *Endocrinology*, 1955, 57, 499.
- 150 SAVARD K. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 202, 457.
- 151 SAVARD K. et Coll. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 6327.
- 152 SCHWARZ V. — *Biochem. J.*, 1953, 53, 148.
- 153 SCHRIEFERS H., KORUS W. — *Z. Physiol. Chem.*, 1958, 313, 6676.
- 154 SILBER R.H. et PORTER C.C. — *Methods of Biochem. Analysis*, 1957, 4, 139-169.
- 155 SILBER R.H. — *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1959, 82, 821.
- 156 SMITH L.L., HALWER M. — *J. A. P. A.*, 1959, 48, 348-352.
- 157 SMITH L.L., FOELL T. — *Anal. Chem.*, 1959, 31, 102-105.
- 158 SMITH L.L., MULLER W.H. — *J. Org. Chem.*, 1959, 31, 1539-1542.
- 159 SPERADIO G.J. et DE KAY H.G. — *J. A. P. A.* (Sci. Ed), 1952, 41, 245.
- 160 SPERO G.B., THOMPSON J.L., MAGERLEIN B.J., HANZE A.R., MURRAY H.C., SZBEK O.K. et HOBG J.A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 6213.
- 161 STAHL E. — *Chem. Ztg*, 1958, 82, 323.
- 162 STANECY H.E. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, 63, 3127.
- 163 STAUDINGER et BEREZA. — *Annalen*, 1911, 380, 243.
- 164 STICH K., ROTZLERE REICHSTEINT. — *Helv. Chim. Acta*, 1959, 42, 1480-1502.
- 165 STOLAR S.M. et BERSTEIN S. — *J. Org. Chem.*, 1961, 26, 5036.
- 166 SWEAT M.C. — *Anal. Chem.*, 1953, 26, 773.
- 167 SZACKOWSKI C.R., O'BRIEN M.G. et MADER W.J. — *Anal Chem.*, 1955, 27, 944.
- 168 TALBOT N.B., SALTZMANN A.H., WISONE R.C. et WOLFE J.K. — *J. Biol. Chem.*, 1945, 160, 535.
- 169 TALBOT N.B., ULICK S., KOUPREIANOW A. et ZYGUMUNTOWICZ. — *J. Clin. Endocrinol. et Metabolism.*, 1955, 15, 301.
- 170 TAMBER H. — *Anal. Chem.*, 1952, 24, 1494.
- 171 T. CHULSKI, ARLINGTON, A. FORIST. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 553-555.

- 172 T. CHULSKI and FORIST. — *J. A. P. A.*, 1958, 47, 533.
- 173 UMBERGER E. J. — *Annal. Chem.*, 1955, 27, 768-773.
- 174 VELLUZ Léon. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, 18, 104-5, 229-244.
- 175 VELLUZ L., PETIT A., PESEZ M. et BARRET R. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1947, fasc. 1-2.
- 176 VERDIER J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1960, 18, 795-799.
- 177 VINCENT-SCHWAL H. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1961, 19, 673-77.
- 177' VIGNERON A. — Autoxydation. Mesures de préventions : Antioxydants. *Soc. Ed. Pharmacie et Sci.*, p. 29.
- 177" *Ibid.*, p. 28.
- 177'" *Ibid.*, p. 112.
- 178 VON M. et ZSCH F. A. — *Ang. Chem.*, 1956, 68, 313.
- 179 VONE A. R. X., NEHER R. — *Helv. Chim. Acta*, 1956, 39, 1664-70.
- 180 WACHSMUTH H., VAN KOEKHOVEN L. — *Anal. Chim. Acta*, 1960, 22, 41-49.
- 181 WAGNER J. G., DALE J. K., SCHLAGEL L. A., MEISTER P. D., BOOTH R. E. — *J. A. P. A. (Sc. Ed.)*, 1958, 47, 580-4.
- 182 WALSER A., SCHLUNKE H. P. — *Experientia*, 1959, 15, 71.
- 183 WENDLER et GRABER. — *Chem. and Indust.*, London, 1956, p. 549.
- 184 WILSON N. H. et FAIRBANKS R. — *Arch. Biochem. et Biophys.*, 1954, 53, 71.
- 185 WINTERSTEINER O., PFIFFER J. J. — *J. Biol. Chem.*, 1936, 116, 291.
- 186 WOLFE J. K., HERSBERG E. B. et FIESER L. F. — *J. Biol. Chem.*, 1940, 130, 653.
- 187 ZAFFARONI A., BURTON R. B. — *J. Biol. Chem.*, 1961, 193, 749.
- 188 ZAFFARONI A., BURTON R. B. — *J. Biol. Chem.*, 1951, 188, 763.
- 189 ZAFFARONI A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 3828.
- 190 ZAFFARONI A., BURTON R. B., et KEUTMANN. — *Science*, 1950, 111, 6.
- 191 ZAFFARONI A., BURTON R. B., KEUTMANN E. H. — *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 109-116.
- 192 ZAFFARONI A. — *Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press N-Y., 1953, XIII, 51.
- 193 6^e Rapport du Comité Mixte F. A. O., O. M. S. d'experts des additifs alimentaires O. M. Rapport technique 1962, 208, 53-54.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	17
PREMIERE PARTIE	
CHAPITRE PREMIER :	
Rappel concernant la structure des stéroïdes	21
CHAPITRE II :	
Formes pharmaceutiques de stéroïdes : comprimés ..	23
CHAPITRE III :	
Séparation et analyse des stéroïdes	27
Chromatographie descendante	29
Système du type Zaffaroni	30
Système du type Bush	32
Chromatographie ascendante	33
Chromatographie horizontale	34
Chromatographie en couches minces	34
CHAPITRE IV :	
Identification et dosage des corticostéroïdes	37
Réactions utilisant la propriété réductrice de la chaîne latérale	37
Réaction de Porter et Silber	40
Réactions indirectes par oxydation de la chaîne latérale	41
Réactions du groupement insaturé du noyau A	42

Réactifs généraux du groupement carbonyle	43
Réactions d'halochromie	46
Réactions différentielles des 11 - céto et des 11 - hydroxy- stéroïdes	48
Applications à la révélation des stéroïdes sur les chromatogrammes	49
Techniques de révélation par des réactions indirectes	52

CHAPITRE V :

Les points sensibles de la molécule	57
Chaîne latérale 17 α , 21 - diol 20 - one	57
Groupement insaturé du noyau A	61

CHAPITRE VI :

Protocole de contrôle	65
Protocole d'extraction des stéroïdes comprimés des pharmacopées	66
Protocole de contrôle d'après les comprimés	70

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE VII :

Bases et conditions de nos recherches	75
But poursuivi	76
Stéroïdes retenus	79
Composition des milieux étudiés	80
Conditions expérimentales	83

CHAPITRE VIII :

Méthodes d'extraction	85
Extraction par l'alcool absolu	86
Extraction par le chloroforme	86
Applications au dosage des corticostéroïdes dans les poudres	88

CHAPITRE IX :

Méthodes retenues pour les mesures quantitatives ...	91
Réaction de Porter et Silber	92
Absorption en U. V.	93
Réaction à l'I. N. H.	93
Courbes étalons	96-98

CHAPITRE X :

Protocole expérimental et résultats	99
Discussion des résultats de l'analyse quantitative	109

CHAPITRE XI :

Méthodes retenues pour l'analyse qualitative	113
Chromatographie système de solvant type Zaffaroni ..	114
Chromatographie système de solvant type Bush	117
Réactions de révélations	118

CHAPITRE XII :

Aspects qualitatifs de la conservation	125
Résultats de l'analyse qualitative	125
Essais d'interprétation concernant les extraits alcooliques d'Hydrocortisone	131
Essais d'interprétation concernant les extraits alcooliques de Prédnisone	132
Essais d'identification des corps formés	135

CHAPITRE XIII :

Résumé et commentaires des résultats	139
--	-----

CONCLUSIONS	145
-------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	147
---------------------	-----

